Année scolaire

1976 1977

N° d'ordre : 2

THESES

présentées

A L'UNIVERSITE DE BORDEAUX II

Unité d'Enseignement et de Rscherches des Sciences pharmaceutiques

pour

LE DOCTORAT D'ETAT EN PHARMACIE

par Catherine-Edith ROUYER née DUBERNET

Pharmacien

Licenciée ès Sciences

Diplômée d'études supérieures de contrôle physico-chimique des médicaments

Assistant de Faculté - Assistant des Hôpitaux

née le 6 juillet 1944 à Cauderan (Gironde)

1ere Thèse : Etude sur la structure et le métabolisme des lipoprotéines sériques

2e Thèse : La lipoprotéine X

Présentées et Soutenues publiquement le **lundi 25 avril 1977**
devant la Commission d'Examen

M. F. TAYEAU	Professeur	Président
M. R. CROCKETT	Professeur	Juges
M. E. JOUZIER	Maître de Conférences Agrégé	
M. L. DOUSTE-BLAZY	Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse	
M. P. REBEYROTTE	Maître de Recherches au C.N.R.S.	

Editions Bergeret, 71-73, rue Leyteire – BORDEAUX – Tél. (56) 91.12.59

Année scolaire

1976 1977

N° d'ordre : 2

THESES

présentées

A L'UNIVERSITE DE BORDEAUX II

Unité d'Enseignement et de Recherches des Sciences pharmaceutiques

pour

LE DOCTORAT D'ETAT EN PHARMACIE

par Catherine-Edith ROUYER née DUBERNET

Pharmacien

Licenciée ès Sciences

Diplômée d'études supérieures de contrôle physico-chimique des médicaments

Assistant de Faculté - Assistant des Hôpitaux

née le 6 juillet 1944 à Caudéran (Gironde)

1ere Thèse : Etude sur la structure et le métabolisme des lipoprotéines sériques

2e Thèse : La lipoprotéine X

Présentées et Soutenues publiquement le **lundi 25 avril 1977**
devant la Commission d'Examen

M. F. TAYEAU	Professeur	Président
M. R. CROCKETT	Professeur	Juges
M. E. JOUZIER	Maître de Conférences Agrégé	
M. L. DOUSTE-BLAZY	Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse	
M. P. REBEYROTTE	Maître de Recherches au C.N.R.S. ...	

Editions Bergeret, 71-73, rue Leyteire – BORDEAUX – Tél. (56) 91.12.59

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MES PARENTS

A MON MARI

A Delphine

A MA FAMILLE

A MES AMIS

Aux membres

du laboratoire de Biochimie Médicale A

A nos maîtres

de l'Université de Bordeaux

A la mémoire de Monsieur le Professeur Michel MACHEBŒUF

qui, de 1937 à 1950, a occupé la chaire dans laquelle nous avons travaillé et qui a été le pionnier des recherches sur les lipoprotéines. Avec une extraordinaire prescience, il a saisi tout de suite l'intérêt de cette importante question.

Que ce modeste travail soit un hommage à sa mémoire.

A Monsieur le Professeur A.M. GOTTO Jr

Professeur au Baylor College of Medicine et au Methodist Hospital de Houston Texas

qui, avec une très grande amabilité, nous a fourni de très précieux documents sur ses recherches.

A Monsieur le Professeur Louis DOUSTE-BLAZY

Professeur de Biochimie Médicale
à l'Université Paul Sabatier de Toulouse
Biologiste des Hôpitaux
Directeur de l'Unité de Recherches INSERM
sur la Biochimie des lipides
Docteur ès-Sciences
Officier des Palmes académiques

Vous nous faites un très grand honneur en acceptant de venir juger notre travail. Vous nous avez toujours témoigné beaucoup de bienveillance. Nous vous en remercions et nous vous prions de bien vouloir trouver ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur Pierre REBEYROTTE

Maître de Recherches au Centre National
de la Recherche Scientifique
Docteur ès-Sciences
Croix de Guerre 1939-1945

Avec une extrême bienveillance, vous nous avez toujours prodigué de précieux conseils et vous nous avez initiée aux techniques nouvelles. Veuillez trouver ici l'expression de notre fidèle et très respectueux attachement.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur Etienne JOUZIER

Directeur Adjoint de l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques
Licencié ès-Sciences
Maître de Conférences agrégé de Chimie Biologique

Nous vous remercions de la compréhension que vous nous avez témoignée à l'occasion de ce travail et nous vous exprimons toute notre reconnaissance pour accepter de le juger.

Monsieur le Professeur René CROCKETT

Directeur de l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques
Professeur titulaire à titre personnel
(Biochimie Pharmaceutique)
Licencié ès-Sciences
Chef de Service des Hôpitaux de Bordeaux
Chevalier des Palmes académiques

Nous vous remercions pour le grand honneur que vous nous faites en acceptant de siéger à notre jury pour juger ce travail.
Nous tenons à vous exprimer notre reconnaissance et notre gratitude.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Francis TAYEAU

Doyen Honoraire de la Faculté de Médecine et de Pharmacie
Professeur de Biochimie Médicale A
Membre titulaire de l'Académie Nationale de Médecine
Médecin Biologiste des Hôpitaux, Chef de Service
Docteur ès Sciences
Officier de la Légion d'Honneur
Commandeur des Palmes Académiques
Officier de l'Ordre National du Mérite
Chevalier de la Santé Publique
Chevalier du Mérite Agricole
Médaille de Vermeil du Service de Santé de la Marine
Officier du Mérite Scientifique
Grand' Croix de l'Ordre du Saint Sépulcre de Jérusalem
Commandeur de l'Ordre National Sénégalais
Commandeur de l'Ordre National Ivoirien
Titulaire de l'Ordre Sépasse (1ère Classe) (Iran)
Titulaire (2ème Degré) de la Décoration Danesch (Iran)
Officier de l'Ordre National du Cèdre (Liban)
Docteur Honoris Causa de l'Université de Téhéran (Iran)
Professeur Honoraire de l'Université San Marcos de Lima (Pérou)

Vous nous faites le très grand honneur de présider notre jury de thèse. Vous nous avez inspiré le sujet de ce travail et vous nous avez guidée dans nos recherches avec beaucoup de compétence. Nous avons toujours apprécié vos grandes qualités humaines. Nous tenons à vous exprimer toute notre reconnaissance et notre profond attachement.

ÉTUDE SUR LA STRUCTURE ET LE MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES SÉRIQUES

Travail effectué au laboratoire de Biochimie Médicale A
de l'Université de Bordeaux II

(Professeur F. TAYEAU)

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION 5

CHAPITRE I - STRUCTURE DES LIPOPROTEINES SERIQUES ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE - RECHERCHES PERSONNELLES 9

I - Etude bibliographique 11

A - Les constituants des lipoprotéines sériques 11
1°- lipides 11
2°- protéines 12

B - Les associations lipido-protéidiques 14
1°- les cénapses 15
2°- les liaisons lipides-protéines 16
3°- premières hypothèses sur la structure des associations lipides - protéines 17

C - Identification des lipoprotéines sériques 22
1°- électrophorèse 22
2°- ultracentrifugation 25

D - Apoprotéines 27
1°- apoprotéine A 27
2°- apoprotéine A III 30
3°- apoprotéine B 30
4°- apoprotéine C I 31
5°- apoprotéine C II 31
6°- apoprotéine C III 31
7°- apoprotéine riche en arginine 32

E - Structure des lipoprotéines sériques 35
1°- chylomicrons et VLDL 36
2°- LDL 37
3°- HDL 42
4°- discussion sur les modes de liaison 52

Pages

II - Recherches personnelles 55

A - Essais préliminaires 57
1°- Essais sur le sérum de Cheval 58
a) Action de l'oléate de sodium 58
b) Action du saponoside 62
2°- Essais sur le sérum d'Homme 63
a) Action de l'oléate de sodium 64
b) Action du saponoside 66

B - Etude sur la β-lipoprotéine 68
1°- Préparation 68
2°- Etude de la fraction obtenue 68
a) Electrophorèse 69
b) Immunoélectrophorèse 69
c) Immunoélectrophorèse bidimensionnelle 69
d) Ultracentrifugation 71
e) Focalisation ionique 71
3°- Expériences sur l'extraction du cholestérol 73
a) Action de l'oléate de sodium 73
b) Action du saponoside 76

C - Discussion 77

Conclusions du chapitre I 80

CHAPITRE II - LE METABOLISME DES LIPOPROTEINES SERIQUES 83

I - Etude bibliographique 87

A - Biosynthèse des lipoprotéines sériques 87
1°- Premières tentatives sur la synthèse des lipoprotéines 88
2°- Biogenèse des diverses lipoprotéines 89
a) Chylomicrons 89
b) VLDL 90
1- synthèse hépatique 90
2- synthèse intestinale 94

Pages

c) LDL 94
d) HDL 95

B - Catabolisme des lipoprotéines sériques 96
1°- les enzymes du catabolisme des lipoprotéines .. 96
a) La lipoprotéine lipase 96
1- nature 97
2- activateurs-inhibiteurs 98
3- études physiologiques 98
b) La lécithine : cholestérol-acyl-transférase..... 100
1- mode d'action 101
2- substrat 102
3- activateurs-inhibiteurs 102
4- études physiologique et pathologique 102
c) La triglycéride lipase 103
d) Les phospholipases 104
2°- Catabolisme des diverses lipoprotéines 104
a) Chylomicrons 104
b) VLDL 106
c) LDL 107
d) HDL 108
3°- Les interactions au sein du catabolisme des lipoprotéines 108

II - Recherches personnelles 111

A - Intégration d'oléate de sodium au sein des lipoprotéines 111
1°- Etude sur le sérum sanguin 114
a) Fixation de l'oléate de sodium sur les fractions du sérum sanguin 114
b) Stabilité de la liaison protéine-oléate 116
c) Mode de fixation de l'oléate sur les protéines 119

2°- Etude sur la β-lipoprotéine 123
a) Affinité de la β-lipoprotéine humaine pour l'oléate de sodium 123

Pages

b) Comportement électrophorétique des complexes β-lipoprotéine -oléate de sodium 129
c) Etude du mélange β-lipoprotéine-oléate de sodium à l'électrofocalisation 130

B - Comportement d'une β-lipoprotéine à l'incubation 132
1°- Etude chimique et électrophorétique de la β -lipoprotéine pure incubée 133
a) Etude chimique 134
b) Etude électrophorétique 138
c) Etude en électrofocalisation 141

2°- Discussion 143

Conclusions du chapitre II 145

CONCLUSIONS GENERALES 147

BIBLIOGRAPHIE 151

INTRODUCTION

Au cours des trois dernières décennies, la biochimie a connu un essort au-delà de toutes les prévisions . Les constituants de la matière vivante ont livré peu à peu la plupart des secrets de leur constitution et de leur structure, ce qui a permis l'étude rationnelle de leurs transformations continuelles au sein de la matière vivante et ainsi de pénétrer toujours plus profondément dans le mystère de la vie .

Les progrès les plus spectaculaires concernent sans doute la constitution et surtout le rôle des acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques ; les nombreux prix Nobel en physiologie ou en médecine décernés dans ce domaine (Ochoa et Kornberg ; Crick, Watson et Wilkins ; Jacob, Lwoff et Monod, Holley, Khorana et Nirenberg ; Delbrück , Hershey et Luria ; Edelman et Porter) en constituent la justification . Il ne faudrait pas cependant négliger pour cela les très importantes recherches réalisées dans d'autres domaines . Peut-être moins spectaculaires, elles concourent néanmoins et d'une façon très efficace à nos connaissances sur la structure de la matière vivante .

Parmi ces recherches, il convient de réserver une place toute particulière à la structure des associations lipido-protéidiques et à leur métabolisme, problème qui, pendant des années, a fait l'objet de très nombreuses publications, pleines d'intérêt, certes, mais reposant sur des hypothèses souvent fragiles . La découverte des apoprotéines, puis l'application de techniques physiques nouvelles à la détermination des structures ont fait faire en quelques années des progrès considérables à ce problème et l'on est à peu près fixé aujourd'hui, non seulement sur la structure, mais encore sur la biosynthèse et le catabolisme des diverses associations lipido-protéidiques.

Les complexes formés par l'union des lipides et des protéines (cénapses lipidoprotéidiques) ont été mis en évidence par Michel Machebœuf dès 1928 (169). A la suite de cette découverte, Machebœuf et ses élèves, et en particulier Sandor (228), Delage (58), Tayeau (277), Polonovski (210), Rebeyrotte (213), ont cherché à préciser la nature des liaisons unissant les deux constituants . Par ailleurs, Tayeau, son disciple, a continué à travailler sur ce sujet (280) et plusieurs thèses réalisées par ses élèves ont porté sur cette question .

Si nous sommes assez bien renseignés aujourd'hui sur la structure des lipoprotéines, il faut reconnaître qu'il existe encore de nombreux points obscurs, en particulier la nature des liaisons qui, dans chaque type de lipoprotéines, unissent entre eux les divers constituants : des hypothèses intéressantes ont été émises, mais les discussions à leur sujet ne sont cependant pas terminées. Il faut réserver aussi une place particulière aux deux formes de cholestérol, dont la situation au sein de la molécule continue à poser des problèmes ; ces deux formes n'ont pas toujours des destinées parallèles (15) .

Lorsque nous sommes venue lui demander un sujet de travail , en vue d'une thèse future, notre Maître, M . le Professeur Tayeau, nous proposa de reprendre, avec des techniques plus modernes et surtout des préparations plus pures, l'étude de la structure et du métabolisme des associations lipido-protéidiques, en nous demandant de nous pencher plus particulièrement sur les deux états du cholestérol et la situation qu'ils occupent dans les particules lipoprotéidiques, problème qui a fait l'objet de plusieurs litiges, puis d'envisager le comportement, au cours de l'incubation, d'associations artificielles protéines-lipides .

Notre travail répond au programme qui nous a été fixé et comporte deux chapitres : le premier a trait à la structure des lipoprotéines du sérum sanguin et à la situation respective du cholestérol libre et du cholestérol estérifié au sein de la β -lipoprotéine humaine; le second concerne l'aspect métabolique du problème et comporte une étude sur l'incorporation des acides gras dans la β -lipoprotéine et le comportement de cette fraction au cours de l'incubation .

La quasi totalité des revues générales sur ce sujet étant en langue anglaise, nous avons jugé opportun de développer particulièrement les travaux effectués sur les lipoprotéines, désirant présenter, en plus de nos recherches personnelles, une monographie sur la question .

Nous ne voudrions pas terminer cette introduction sans rendre hommage à tous ceux qui, à des titres divers, ont contribué à la réalisation de ce travail, soit par des conseils qu'ils nous ont donnés, soit par l'aide qu'ils nous ont apportée .

Nous voudrions d'abord remercier tout particulièrement Madame Marie-José Maviel, qui, par son aide et ses compétences techniques dans divers domaines, nous a beaucoup aidée pour la réalisation de certaines expériences . Nos remerciements s'adressent également à Madame Nicole Girol qui, avec dévouement et patience, a dactylographié nos projets de rédaction .

Monsieur le Professeur Marquevielle nous a réservé un chaleureux accueil dès notre entrée dans le service et nous a permis de découvrir notre futur métier en nous initiant aux techniques du laboratoire . De plus, il nous a fait souvent profiter de son très grand savoir .

Madame le Professeur agrégé Séchet et Monsieur le Professeur agrégé Jouzier nous ont toujours accordé leur aide et témoigné beaucoup de bienveillance ; nous tenons également à les en remercier .

Monsieur le Professeur Jensen nous a aidée très efficacement dans l'interprétation de certaines expériences . Nous tenons à lui exprimer notre vive gratitude .

Monsieur Pierre Rebeyrotte, Maître de Recherches au CNRS ne nous a jamais ménagé ses conseils et ses connaissances et nous a apporté à chaque instant une aide précieuse dans la découverte et la réalisation des nouvelles techniques de recherches .

Madame Nicole Rebeyrotte, Maître de Recherches à l'INSERM, nous a enseigné les techniques mettant en œuvre les isotopes radioactifs ; grâce à son amabilité , nous avons pu réaliser diverses expériences de ce travail . Qu'ils en soient tous deux très sincèrement remerciés .

Enfin, Monsieur le Doyen Tayeau, qui nous a inspiré et confié ce travail, en a suivi sa progression à chaque instant avec beaucoup de rigueur et un merveilleux esprit de synthèse et cela sans jamais ménager sa peine et son temps . Nous voulons l'assurer de notre profonde reconnaissance et de notre admiration .

CHAPITRE I

STRUCTURE DES LIPOPROTEINES SERIQUES

Etude bibliographique

Recherches personnelles

I - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Nous ne pensons pas superflu de présenter tout d'abord un très court résumé sur les lipides et sur les protéines qui entrent dans la constitution des lipoprotéines du sérum sanguin, en raison des allusions continuelles qui sont faites plus loin à ces constituants. Nous envisagerons ensuite les travaux réalisés sur leur mode d'union, alors que la composition et la structure des protéines sériques était encore mal connue . Nous étudierons alors les diverses fractions lipido-protéidiques (lipoprotéines) du sérum sanguin, puis nous indiquerons les recherches sur leur fractionnement et l'identification de leurs fractions, ce qui a permis de reprendre sur des bases beaucoup plus solides l'étude de la constitution des lipoprotéines .Il pourrait paraître superflu d'évoquer des travaux anciens, effectués pour la plupart sur des fractions souvent hétérogènes . Nous ne le pensons pas, car à l'analyse il apparaît que bien des phénomènes récemment décrits avaient déjà été mis en évidence et il nous a paru intéressant de le rappeler . Nous exposerons enfin les travaux les plus récents sur la structure des lipoprotéines .

A - LES CONSTITUANTS DES LIPOPROTEINES SERIQUES

1°- Lipides .

Le sérum sanguin de l'Homme à jeun renferme de 5 à 7,5 g de substances lipidiques par litre . Ces substances sont constituées par des triglycérides (0,5 à 1,25 g) , des phospholipides (1,5 à 2,5 g), du cholestérol (1,5 à 2,6 g) existant soit à l'état libre (0,5 à 0,8 g), soit à l'état estérifié (1 à 1,8 g) et des acides gras

libres (0,10 à 0,30 g) ; à côté de ces substances, on rencontre également de petites quantités de cérébrosides et de glucolipides complexes , ainsi que des caroténoïdes .

2°- Protéines.

Le sérum sanguin de l'Homme renferme environ 75g de protéines par litre . Dès 1881 , on a cherché à fractionner ces protéines et Panum (199), le premier, a défini deux fractions : celle précipitant par simple dilution du sérum à l'aide d'eau distillée et celle restant en solution . La première de ces fractions a été désignée par des vocables variés selon les auteurs : substances fibrinoplastiques (Panum (199), globulines (Schmidt (242) et Lehmann (156)) , paraglobulines (Kuhn (145)), alcali-albumine (Eichwald (67)) . La seconde a été appelée sérumalbumine. .

Peu de temps après, de nouvelles techniques de fractionnement étaient proposées : ces techniques mettaient en œuvre les sels les plus variés en solution concentrée : sulfate de magnésium (Denis (60), Burkhardt (41) , Starke (266)), sulfate de sodium (Homer (125) et Pinkus (205), Howe (127), Lefron et Bonnet (155)), acétate de sodium (Lewith (160)), sulfate de cuivre (Kalcheval (141)) , citrate de sodium (Jameson . et Roberts (137)) , sulfite de sodium (Campbell et Hanna (49)) , etc ...Mais , parmi toutes ces techniques utilisant les sels, la méthode de Hofmeister (124) non seulement resta la plus utilisée, mais était encore mise en œuvre, il y a quelques années , dans certains laboratoires de biologie clinique . Cette méthode de relargage, comme d'ailleurs la plupart des techniques précitées, était fondée sur le fait que, si l'on trace la courbe représentative des variations du poids de protéines précipitées du sérum en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium, on constate qu'il existe dans cette courbe un palier séparant deux fractions . Ayant isolé ces deux fractions, Hofmeister les analysa et constata qu'elles présentaient des compositions non identiques . Il conclut qu'il avait affaire à deux fractions différentes : à la première, il donna le nom de globulines et à la seconde celui d'albumines . Ces appellations , identiques à celles des fractions obtenues par d'autres techniques, amenèrent une très sérieuse confusion dans les esprits : les fractions de même nom étaient, en effet, différentes selon la technique proposée .

Les globulines furent fractionnées à leur tour et divisées en euglobulines, insolubles dans l'eau pure, et pseudoglobulines, solubles dans l'eau pure (Marcus (180)) . Les albumines firent aussi l'objet de fractionnements (Halliburton (109), Oppenheimer(198), etc. .) .

Les deux principales fractions, obtenues par relargage à l'aide du sulfate d'ammonium, furent alors analysées en détail ; leur teneur en aminoacides fut déterminée, ainsi que leur pH isoélectrique, leur pression osmotique, etc ...

Beaucoup de travaux, concernant aussi bien les protéines que les lipoprotéines, reposèrent sur la séparation de ces deux fractions, qui n'étaient en réalité que des mélanges hétérogènes de sous-fractions, parfois très différentes, comme l'avaient déjà montré jadis Tayeau et Martin (297), Mac Farlane, Montgomerry,Cohn (57), Derrien, Roche et Mandel (61) et beaucoup d'autres auteurs.

La découverte de l'électrophorèse, d'abord en veine liquide (Blix et Tiselius (34)), puis sur papier (Cremer,Tiselius et Durrum), allait permettre l'obtention de fractions beaucoup plus pures et bien mieux définies ; ainsi les protéines sériques étaient-elles fractionnées en sérumalbumine (55 p.100), α_1 globulines (5 p. 100), α_2 globulines (9 p.100) , β globulines (13 p.100) et γ globulines (18 p.100). Par la suite, de nombreux perfectionnements ont été apportés à cette méthode, en particulier l'utilisation de supports variés permettant une sélectivité parfois très poussée (acétate de cellulose, gélose, agarose, amidon, polyacrylamide, etc ...). Enfin, l'immunoélectrophorèse, d'abord monodimensionnelle,ensuite bi-dimensionnelle, a permis un fractionnement beaucoup plus sélectif et l'on met ainsi en évidence par cette dernière technique près de soixante fractions différentes , identifiées la plupart du temps par des immunsérums monospécifiques .

En même temps que l'électrophorèse, l'ultracentrifugation était utilisée à son tour et permettait,elle aussi, un intéressant fractionnement ; nous reviendrons plus loin sur cette méthode à propos des diverses lipoprotéines du sérum sanguin .

Signalons encore pour mémoire la méthode de Cohn(57), utilisant l'alcool à très basse température et les variations de force ionique ; cette méthode a permis l'isolement de très nombreuses fractions et a connu une importante application industrielle .

Mentionnons enfin que les diverses protéines sériques peuvent être fractionnées par filtration moléculaire, sur gels de Séphadex en particulier (85) .

B - LES ASSOCIATIONS LIPIDO-PROTEIDIQUES

Les lipides plasmatiques ont longtemps représenté une énigme : ces substances, constituées, nous l'avons vu, par des glycérides, des phospholipides, des stérides et des stérols, sont insolubles dans l'eau ; elles se trouvent cependant dans le plasma sanguin à l'état dissous ; bien plus, si l'on agite du plasma avec de l'éther, qui constitue pourtant un excellent solvant des lipides, on n'extrait que des traces de graisses, la majeure partie restant au sein de la phase aqueuse (Hoppe-Seyler (126)) . Pour expliquer cet état particulier des lipides plasmatiques, plusieurs hypothèses avaient été proposées : les émulsions de lipides dans l'eau se montrant moins instables en présence d'alcalis, l'alcalinité du sang fut incriminée comme responsable de la stabilité des lipides (Thudicum (308)) ; la mise en évidence d'émulsions stables lipides-sels biliaires avait fait attribuer à ces dernières substances la "dissolution aqueuse" des lipides plasmatiques (Long et Gephart (163)) . Ces hypothèses tombèrent très rapidement en désuétude ; on sait,en effet, que le sang est presque neutre (pH 7,35) et que, par ailleurs, il contient seulement des traces de sels biliaires, insuffisantes en tout cas pour maintenir les lipides "à l'état dissous" .

A la suite des recherches de Biedermann (28) et surtout de Ciaccio (56), les protéines furent rendues responsables du "masquage" des lipides : ce dernier auteur montra, en effet, que, si l'on veut colorer tous les lipides cellulaires, il est indispensable de détruire préalablement les protéines, par des protéases par exemple.

Le rôle des protéines ne pouvait cependant être admis qu'après la mise en évidence d'associations définies entre les lipides et les protéines . Divers auteurs étaient parvenus à préparer artificiellement des "complexes" albumines-lécithines (Mayer et Terroine(184), Porges et Neubauer (212)) , Feinschmidt (78)), mais ces associations , souvent lactescentes et assez peu stables, ne se comportaient pas comme celles du plasma sanguin . Il était donc nécessaire,pour entraîner la conviction, d'isoler des associations lipido-protéidiques naturelles .

1°- Les cénapses lipido-protéidiques.

C'est à Machebœuf (169) que revient le mérite d'avoir mis en évidence, le premier, l'existence de telles associations . Cet auteur isole de la fraction "albumines" du sérum de Cheval (fraction protéidique soluble dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation) (*) un "complexe" lipido-protéidique , qui, après un certain nombre de purifications, conserve toujours la même composition en lipides et en protéines . Ce complexe se montre très riche en substances lipidiques (40 p.100 environ) ; malgré cela, il est très soluble dans l'eau . Machebœuf crée le terme de cénapses(170) pour désigner les associations entre ces deux constituants ; ce terme ne préjuge nullement du mode de liaison qui les unit . La cénapse ainsi isolée par Machebœuf apportait donc la preuve de l'existence d'associations lipido-protéidiques au sein du plasma sanguin .

Par la suite, cette cénapse, appelée encore cénapse acido-précipitable (en raison de son mode d'obtention), a fait l'objet de nombreuses études chimiques et physico-chimiques .Contrairement à d'autres lipoprotéines, elle ne contient ni cholestérol libre, ni céphaline, ni sphingomyéline ; elle renferme seulement du cholestérol estérifié et des lécithines (59) . Cette fraction a suscité de nombreux travaux (détermination des constantes physico-chimiques, dénaturation, isolement, etc....(voir 287)).

(*) Cette fraction, on l'a su par la suite, est constituée d'un mélange de fractions diverses parmi lesquelles des globulines, ainsi que nous l'avons signalé plus haut.

Les lipides sériques ne se trouvaient que partiellement dans cette fraction; les autres lipides étaient répartis dans les autres fractions du sérum . On admettait même, à cette époque, que les diverses fractions du sérum renfermaient toutes des lipides . Aussi la plupart des essais étaient-ils effectués généralement sur le sérum total, en particulier ceux relatifs aux liaisons lipides - protéines (*) .

2°- Les liaisons lipides-protéines .

Bien avant que fussent isolées les premières cénapses lipido-protéidiques, plusieurs auteurs (Erlandsen (76), Troensgaard et Koudahl (310)) admettaient que les deux constituants devaient être unis par des liaisons ioniques . Sœrensen (261) avait critiqué cette conception, en raison de la rupture possible de ces liaisons à l'aide de l'alcool .

Un certain nombre de recherches furent alors réalisées par Machebœuf et ses élèves . Nous ne croyons pas inopportun de les rappeler en raison du rôle qu'elles ont joué dans la connaissance de ce problème .

Machebœuf et Sandor (175) étudient l'action exercée sur le sérum sanguin par un mélange d'éther et d'alcool; les quantités d'alcool utilisées sont relativement minimes afin de ne pas provoquer la dénaturation des protéines . Dès que la teneur en alcool de l'éther atteint 6 p. 100, ce dernier solvant extrait en vingt-quatre heures plus de la moitié des lipides sériques . L'extraction porte sur toutes les variétés de lipides et l'extrait éthéré contient aussi bien des phospholipides que du cholestérol . A la suite de ces constatations, Machebœuf et Sandor admettent que les lipides et les protéines se trouvent liés grâce à la solvatation réciproque de leurs chaînes polyméthyléniques homologues . On sait que de telles

(*) Citons à ce propos l'index lipoalbuminique de Machebœuf et Wahl (178), utilisé dans le diagnostic de la néphrose lipoïdique, qui correspondait au nombre de grammes de lipides fixés à 100 g d'albumines. Il s'agissait évidemment des albumines selon Hofmeister. On sait aujourd'hui que les albumines ne renferment que de très faibles quantités de lipides (acides gras).

chaînes existent à la fois dans les protéines (restes polyméthyléniques de leucine, valine, phénylalanine, etc ..) et dans les lipides (chaînes polyméthyléniques d'acides gras, chaîne de l'iso - octane du cholestérol) . Ils supposent encore que les quelques fonctions polaires des lipides s'orientent à la périphérie ou se placent auprès des fonctions polaires de la protéine, assurant à l'ensemble la stabilité en phase aqueuse .Autour de ces fonctions se crée une ambiance aqueuse, véritable élément de protection vis-à-vis de l'éther par exemple . Cette conception explique que l'alcool ajouté à l'éther puisse favoriser l'extraction des lipides, car il fait diminuer "l'ambiance aqueuse contrainte" (Machebœuf) .

Si cette conception de Machebœuf et Sandor correspond à la réalité , il doit être possible de déplacer, par action de masse, les lipides des protéines en faisant agir une substance,elle aussi polyméthylénique, de constitution voisine des lipides et présentant une solubilité dans l'eau suffisante pour atteindre lesprotéines . Cette idée a conduit Machebœuf et Tayeau (176) à étudier l'extraction des lipides sériques par l'éther en présence de savons alcalins . Dans certaines conditions, l'éther parvient ainsi à extraire les trois-quarts des substances lipidiques (glycérides, phospholipides, stérides et stérols) . Cette observation constitue un argument en faveur de la théorie de Machebœuf et Sandor (*) .

3°- Premières hypothèses sur la structure des associations lipides-protéines .

A la suite de cette série de recherches et de celles réalisées par Dervichian (62), Machebœuf (175) a émis une hypothèse sur la structure de la macromolécule de lipoprotéine, dont nous indiquerons les grandes lignes .

Dervichian (64) considère la macromolécule de protéine comme formée de deux couches à symétrie hexagonale : chacune

(*) Signalons que le taux d'extraction des lipides par l'éther, soit en présence de savons, soit en présence d'alcool, soit encore en présence de substances variées (héparine, sulfate de dextrane, etc...), varie d'un individu à l'autre et dépend pour une grande part du groupe sanguin de l'individu (Magis (179)).

de ces deux couches serait constituée par une chaîne polypeptidique entortillée dans le plan horizontal de façon que soient symétriquement disposés les restes des aminoacides constitutifs ;chaque couche aurait sur l'une des faces les groupements polaires,sur l'autre les groupements apolaires . Les deux feuillets seraient accolés par leur face hydrophobe, si bien que la molécule présenterait vers l'eau ambiante ses groupes polaires (fig. 1) .

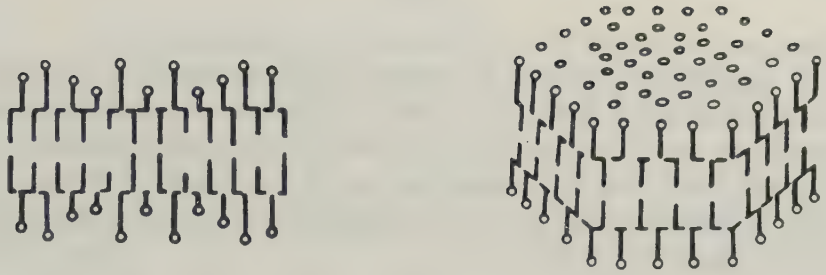
Machebœuf conçoit alors pour les lipides deux façons d'être unis aux protéines :

a) par apposition des molécules lipidiques sur les faces latérales apolaires de la molécule protéique (fig.2). Ce schéma correspondrait aux cénapses les moins stables(décomposables par l'éther en présence de faibles quantités d'alcool) ;

b) par glissement entre les deux feuillets protéidiques (forme sandwich : fig.3) . Cette structure correspondrait aux cénapses les plus stables (résistant, par exemple, à l'action de l'éther en présence d'alcool ou de savons). Cette dernière structure cadrerait parfaitement avec certaines constantes physico-chimiques(voir 171) .

A la suite des recherches précitées, aucune distinction n'est établie entre les phospholipides et le cholestérol et ces deux types de substances sont considérés comme suivant absolument le même sort .

Les observations de Tayeau (279) ont mis cependant en doute ce sort commun des phospholipides et du cholestérol : l'éther , en présence de certains saponosides (en particulier celui provenant du Sapindus mukorosi (283) dont l'aglycone présente certains rapports de structure avec le cholestérol), permet l'extraction élective et quantitative du cholestérol sérique,tandis que les phospholipides restent fixés sur les protéines . De même, le dihydro-abiétate de sodium, qui présente, lui aussi, une structure voisine du cholestérol, ne permet à l'éther que l'extraction de cet alcool ,à l'exclusion de toute autre substance lipidique (Machebœuf et Rebeyrotte (174)). Ces observations ont conduit Machebœuf (171) à la notion d'icélomorphisme : pour "décoller" un lipide donné,la substance mise en œuvre doit présenter une structure voisine .



A : coupe B : perspective

Fig. 1 - Structure d'une macromolécule de protéine telle que la concevait Dervichian (64).

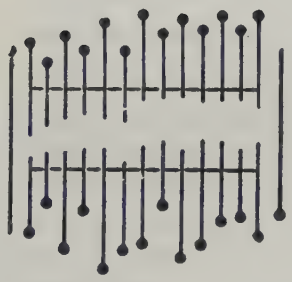


Fig. 2 - Micelle ceinturée par les lipides (d'après Machebœuf (171)).
N.B. On notera que cette théorie ne faisait aucune distinction entre les divers lipides.

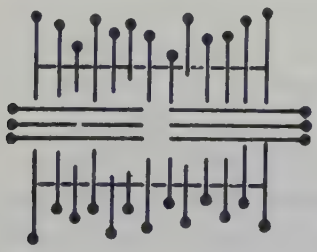


Fig. 3 - Lipides inclus dans la molécule protéidique (forme sandwich) (d'après Machebœuf (171)).

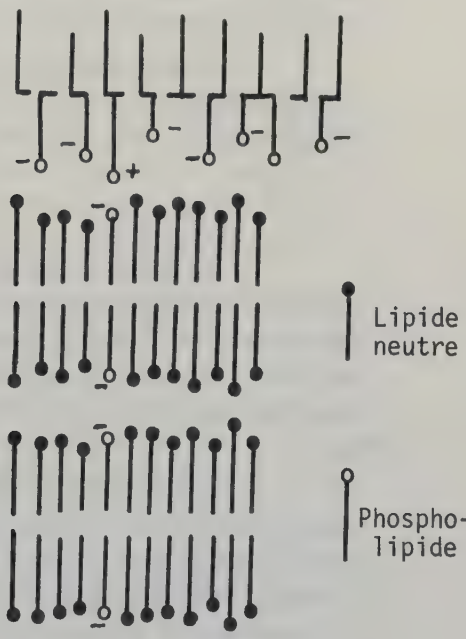


Fig. 4 - Modèle d'association lipides-protéines (conceptions vers 1941).

Par la suite, J. Polonovski (210) a prouvé que les saponiums (savons cationiques) pouvaient "décoller" le cholestérol sérique; selon cet auteur, cette constatation ne serait pas incompatible avec les notions précédentes, car il est fort possible que les chaînes des saponiums se présentent stériquement sous l'aspect polycyclique des stérols (*) .

Le fait qu'il soit possible d'extraire du sérum le cholestérol sans déplacer les phospholipides (action des saponosides) , mais qu'il s'avère impossible de "décoller" les phosphatides sans entraîner le cholestérol (action des savons anioniques) a conduit à penser que, dans les associations lipides-protéines, les phospholipides doivent former le trait d'union entre les protéines et le cholestérol (Tayeau (283)) .

Ces conceptions envisagent de toutes façons des liaisons énergétiquement faibles, type forces de Van der Waals, et ne font encore intervenir aucune liaison ionique .

La découverte des détergents synthétiques allait faire connaître un aspect nouveau du problème . La comparaison entre des complexes variés préparés artificiellement (protéine-détergent, protéine-colorant, protéine-lécithine) et les complexes naturels allait permettre d'apporter à ce problème des solutions satisfaisantes .

Les premières recherches ont montré tout d'abord que les lipides non ionisés ne pouvaient pas former de complexes stables avec les protéines ; il n'en est pas de même pour les lipides ionisés et les phospholipides en particulier . Par ailleurs, les lipides non ionisés peuvent former aisément des complexes stables avec les lipides ionisés . Cette première observation laissait ainsi suggérer que les phospholipides devaient effectivement former l'intermédiaire entre les protéines et les autres substances lipidiques .

(*) Selon Ayrault-Jarrier (17), l'action des détergents ne doit pas être interprétée comme un décollement icélomorphique, mais comme une déformation de la lipoprotéine, permettant alors à l'éther d'arracher les lipides.

L'identité de comportement(voir 63)entre les complexes artificiels protéine-lécithine,dans lesquels les constituants sont unis par une liaison ionique, et les complexes naturels laissait penser que les deux constituants étaient unis dans ces derniers complexes d'une façon identique . La liaison serait formée aux dépens d'un groupe basique de la protéine et d'un groupe acide de la lécithine (62) .

L'étude des complexes "lipides-lipides" et en particulier phospholipides-cholestérol (64) renseigne sur le mode de liaison possible entre les phospholipides et les autres substances lipidiques ; lorsque ces deux types de substances forment des figures myéliniques, il existe une structure stratifiée, composée de doubles couches de lipides, séparées par des couches de molécules d'eau; dans chaque double couche, les molécules de lipides se trouvent côte à côte ; leurs groupements polaires étant orientés vers l'eau et leurs chaînes aliphatiques faisant face à celles de la couche voisine;par extrapolation, on peut penser que la même structure en double couche doit se retrouver dans les micelles lorsqu'elles sont complètement dispersées (Dervichian) . Cette association nécessite la présence d'eau qu'il faut considérer comme un constituant structural .

Il résulte donc de ces diverses observations que l'interaction ionique entre les protéines et les micelles lipidiques peut avoir lieu, les deux constituants demeurant séparés ; au sein de la micelle lipidique, les diverses substances lipidiques sont unies aux phospholipides par des forces du type Van der Waals .Cette conception, qui confirme le rôle des phospholipides comme trait d' union entre les protéines et les autres lipides, explique :

1- que la destruction enzymatique des phospholipides détruit l'association (Nagler (189)) ;

2- que le taux de la lécithinémie conditionne la quantité de lipides neutres susceptibles d'être dissous (Boyd (35), Ahrens et Kunkel (2)) .

La figure 4, empruntée à un ancien travail de Tayeau(287), concrétise cet ensemble de conceptions, confirmé par diverses recherches mettant en œuvre la charge de ces associations, l'extraction de certains lipides, leur comportement électrophorétique (Hartley, Collie et Samis (114)), etc ...

La possible rupture des liaisons protéines-lipides sous l'influence de l'alcool ne va pas à l'encontre d'une liaison ionique, comme le croyait Sœrensen, car les exemples d'alcoolyse ne manquent pas (cas du chlorhydrate de caféine) .

A cette époque, on acceptait donc ce modèle, tout en faisant certaines réserves : par exemple , des recherches réalisées sur la première préparation de lipoprotéines, celle de Machebœuf (168) , avaient prouvé l'absence de liaisons ioniques (Gorter et Heremans (100), Tayeau (282)) .

La variété des lipoprotéines extraites du sérum, le fait que certains lipides résistent à l'extraction alcoolique, laissaient apparaître l'extrême complexité du problème, due aussi à la fragilité des associations et à la facilité avec laquelle elles forment des artefacts . Mentionnons à ce sujet que le simple vieillissement du sérum amène de considérables perturbations dans la nature des liaisons lipides-protéines (Delage (58), Tayeau (278,281,284,304)).

Ces conceptions, faute de mieux, eurent cours jusqu'en 1941 . La découverte de lipoprotéines sériques bien individualisées allait ouvrir la voie à une meilleure connaissance du sujet .

C - IDENTIFICATION DES LIPOPROTEINES SERIQUES

Jusqu'en 1941, on n'était pas très bien fixé sur les fractions protéidiques qui supportaient les lipides . Deux techniques nouvelles allaient permettre de résoudre le problème et d'individualiser ces fractions : l'électrophorèse et l'ultracentrifugation .

1°- Electrophorèse .

Blix, Tiselius et Svensson (34) séparent par électrophorèse deux groupes principaux de lipoprotéines : les α-lipoprotéines et les β-lipoprotéines . Sur le diagramme électrophorétique, les α -lipoprotéines apparaissent au niveau des α_1-globulines et empiètent légèrement sur les albumines ; les β-lipoprotéines n'ont pas toujours une position rigoureusement fixe et se placent au niveau des β_1 -globulines .

Divers supports peuvent être utilisés pour mettre en évidence ces deux grands groupes de lipoprotéines : les résultats obtenus ne sont pas toujours superposables . Des perfectionnements ont été apportés par la suite aux techniques primitivement utilisées et l'on distingue aujourd'hui dans le sérum sanguin , l'α -lipoprotéine, la β-lipoprotéine, la pré- β -lipoprotéine, ainsi qu' une fraction restant sur la ligne de départ et constituée par les chylomicrons . La révélation des lipoprotéines s'effectue à l'aide d e Noir Soudan ou de Red Oil 0 .

Les fractions lipoprotéidiques et en particulier la β-lipoprotéine ont pu être préparées à l'aide de techniques chimiques: citons pour mémoire les méthodes de Cohn et coll. (57) à l'alcool froid et à force ionique variable, de Burstein et Samaille (46) à l'héparine ou au sulfate de dextrane, de Burstein et Prawerman à la poly-vinyl-pyrrolidone, de Tayeau et coll. (301) au leucocyanidol, etc ... Les diverses lipoprotéines du sérum présentent la composition indiquée dans le tableau I (en p. 100 de la fraction) (*) .

(voir tableau I, page suivante)

(*) D'après (134). Il importe, pour être complet, de mentionner l'existence des complexes albumine - acides gras, étudiés par Robinson et coll. (220) et dont la durée de vie est très courte.

Tableau I

Lipoprotéines	protéines	lipides	cholestérol libre	cholestérol estérifié	triglycérides	phospholipides	acides gras libres
α lipoprotéine	52	48	3	14	6	24	1
β lipoprotéine	22	78	8	37	10	22	1
pré- β -lipoprotéine	10	90	7	12	51	18	2
chylomicrons	2	98	3	5	83	7	-

2°- Ultracentrifugation.

A la suite des travaux de Pedersen (200), qui avait noté la différence de densité des protéines et des lipoprotéines séri - ques, Gofman, Lundgren et Elliott (97) définirent plusieurs frac - tions lipoprotéiques obtenues par ultracentrifugation fractionnée . Lewis, Green et Page (159) fournirent les premiers une classification des lipoprotéines . Actuellement, on distingue :

a) les chylomicrons de densité comprise entre 0,940 et 0,950. Leur taille est de l'ordre de 500 nm. Sf > 400 .

b) les VLDL (very low density lipoproteins), de densité comprise entre 0,950 et 1,006 (*) . Leur taille oscille entre 40 et 70 nm. Sf : 20 à 400 .

c) les LDL (low density lipoproteins), de densité comprise entre 1,006 et 1,063 et fractionnées en LDL 1 (densité comprise entre 1,006 et 1,019) et LDL 2 (densité comprise entre 1,019 et 1,063). Leur taille est comprise entre 20 et 40 nm. Sf : 0 à 20 .

d) les HDL (high density lipoproteins), de densité comprise entre 1,063 et 1,210 et fractionnées en HDL 2 (densité de 1,063 à 1,125) et HDL 3 (densité de 1,125 à 1,210) . Leur taille est de 10 à 20 nm.

e) les VHDL (very high density lipoproteins), de densité comprise entre 1,210 et 1,250 .

Ces diverses fractions présentent des compositions différentes, ainsi que le montre le tableau II (en pourcentage) .

(voir tableau II, page suivante)

(*) Les VLDL d'origine hépatique sont parfois désignées sous le nom de lipomicrons.

Tableau II

lipoprotéines	protéines	phospho-lipides	cholestérol libre	cholestérol estérifié	triglycérides	acides gras libres
Chylomicrons	2	7	2	5	84	-
VLDL	10	18	7	12	51	2
LDL	21	22	8	37	11	1
HDL	50	22	3	14	8	3

Il est également intéressant de connaître les rapports qui existent entre les fractions obtenues par électrophorèse et celles préparées par ultracentrifugation . Ces rapports sont assez étroits : par exemple les VLDL sont constituées par des pré β -lipoprotéines , les LDL par les β -lipoprotéines surtout, tandis que les HDL correspondent aux α -lipoprotéines .

De très nombreuses autres recherches ont été effectuées sur ces différentes lipoprotéines : composition des acides gras constitutifs, structure, taille et forme des molécules, etc ... Signalons enfin que les β -lipoprotéines renferment toujours une petite quantité de glucides (galactose, mannose, glucosamine, acide sialique), ainsi que l'ont montré Ayrault-Jarrier, Cheftel et Polonovski (19).

A la suite de ces travaux, quelques recherches avaient été tentées sur la structure des lipoprotéines : mentionnons pour mémoire celles de Van den Heuvel (312) sur la structure de la LDL ; mais les notions sur les lipoprotéines restaient quand même très partielles en raison de la connaissance insuffisante des protéines qui entraient dans leur constitution . La découverte, l'identification et l'étude des apoprotéines allaient permettre de combler cette lacune.

D - APOPROTEINES

Les premières analyses effectuées dans les diverses catégories de lipoprotéines dans le but de déterminer les protéines constitutives avaient laissé présager une relative simplicité de structure: apoprotéine A pour les HDL, apoprotéine B pour les LDL et apoprotéine C pour les VLDL . Très rapidement, le problème apparut beaucoup plus complexe et ce n'est que petit à petit que l'on s'aperçut que les diverses lipoprotéines sériques étaient constituées par plusieurs apoprotéines, se trouvant dans des porportions variables suivant la fraction envisagée . On lira avec intérêt l'exposé des re - cherches effectuées dans ce domaine dans diverses revues générales (157, 204, 4) .

L'application des techniques d'analyse aux diverses apoprotéines , et en particulier les analyses chimiques (détermination de la structure primaire, ordre d'enchaînement des aminoacides , groupes N et C terminaux), physiques (dépolymérisation, gel-filtration, dichroïsme circulaire, spectrographie, diffraction des rayons X, micrographies électroniques,) et immunologiques ont permis de les identifier pour la plupart et même d'établir avec une grande précision leur constitution et leur structure .

Les diverses apoprotéines de l'Homme sont les suivantes :

1°- Apoprotéine A .

Elle se subdivise en deux unités : apoprotéine A I et apoprotéine A II .

L'apoprotéine A I (*) est constituée par une chaîne polypeptidique simple de 245 amino-acides, dont l'enchaînement est parfaitement connu (Baker et coll. (23,24,25)). L'aminoacide N-terminal est l'acide aspartique et le C-terminal la glutamine (fig.5). Le poids moléculaire est d'environ 28.000 .

(*) Appelée encore R-Gln-I

NH_2
|
Asp-Glu-Pro-Pro-Gln-Ser-Pro-Trp-Asp-Arg-Val-Lys-Asp-Leu-Ala-Thr-
5 10 15

Val-Tyr-Val-Asp-Val-Leu-Lys-Asp-Ser-Gly-Arg-Asp-Tyr-Val-Ser-Gln-
20 25 30

Phe-Gln-Gly-Ser-Ala-Leu-Gly-Lys-Gln-Leu-Asn-Leu-Lys-Leu-Leu-Trp-
35 40 45

Asp-Asp-Val-Thr-Ser-Thr-Phe-Ser-Lys-Leu-Arg-Gln-Glu-Leu-Gly-Pro-
50 55 60

Val-Thr-Glu-Glu-Trp-Phe-Asn-Asp-Leu-Gln-Glu-Lys-Leu-Asn-Leu-Glu-
65 70 75 80

Lys-Glu-Thr-Gly-Glu-Leu-Arg-Gln-Glu-Met-Ser-Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-
85 90 95

Val-Lys-Ala-Lys-Val-Gln-Pro-Tyr-Leu-Asp-Asp-Phe-Gln-Lys-Lys-Trp-
100 105 110

Gln-Glu-Met-Glu-Leu-Tyr-Arg-Gln-Lys-Val-Glu-Pro-Leu-Arg-Ala-Glu-
115 120 125

Leu-Gln-Glu-Gly-Ala-Arg-Gln-Lys-Leu-His-Glu-Leu-Gln-Glu-Lys-Leu-
130 135 140

Ser-Pro-Leu-Gly-Glu-Glu-Met-Arg-Asp-Arg-Ala-Arg-Ala-His-Val-Asp-
145 150 155 160

Ala-Leu-Arg-Thr-His-Leu-Ala-Pro-Tyr-Ser-Asp-Glu-Leu-Arg-Gln-Arg-
165 170 175

Leu-Ala-Ala-Arg-Leu-Glu-Ala-Leu-Lys-Glu-Asn-Gly-Ala-Gly-Arg-Leu-
180 185 190

Ala-Glu-Tyr-His-Ala-Lys-Ala-Thr-Glu-His-Leu-Ser-Thr-Leu-Ser-Glu-
195 200 205

Lys-Ala-Lys-Pro-Ala-Leu-Glu-Asp-Leu-Arg-Gln-Gly-Leu-Leu-Pro-Val-
210 215 220

Leu-Glu-Ser-Phe-Lys-Val-Ser-Phe-Leu-Ser-Ala-Leu-Glu-Glu-Tyr-Thr-
225 230 235 240

Lys-Leu-Asn-Thr-Gln-COOH
245

Fig. 5 - Séquence des aminoacides de l'apoprotéine A I humaine

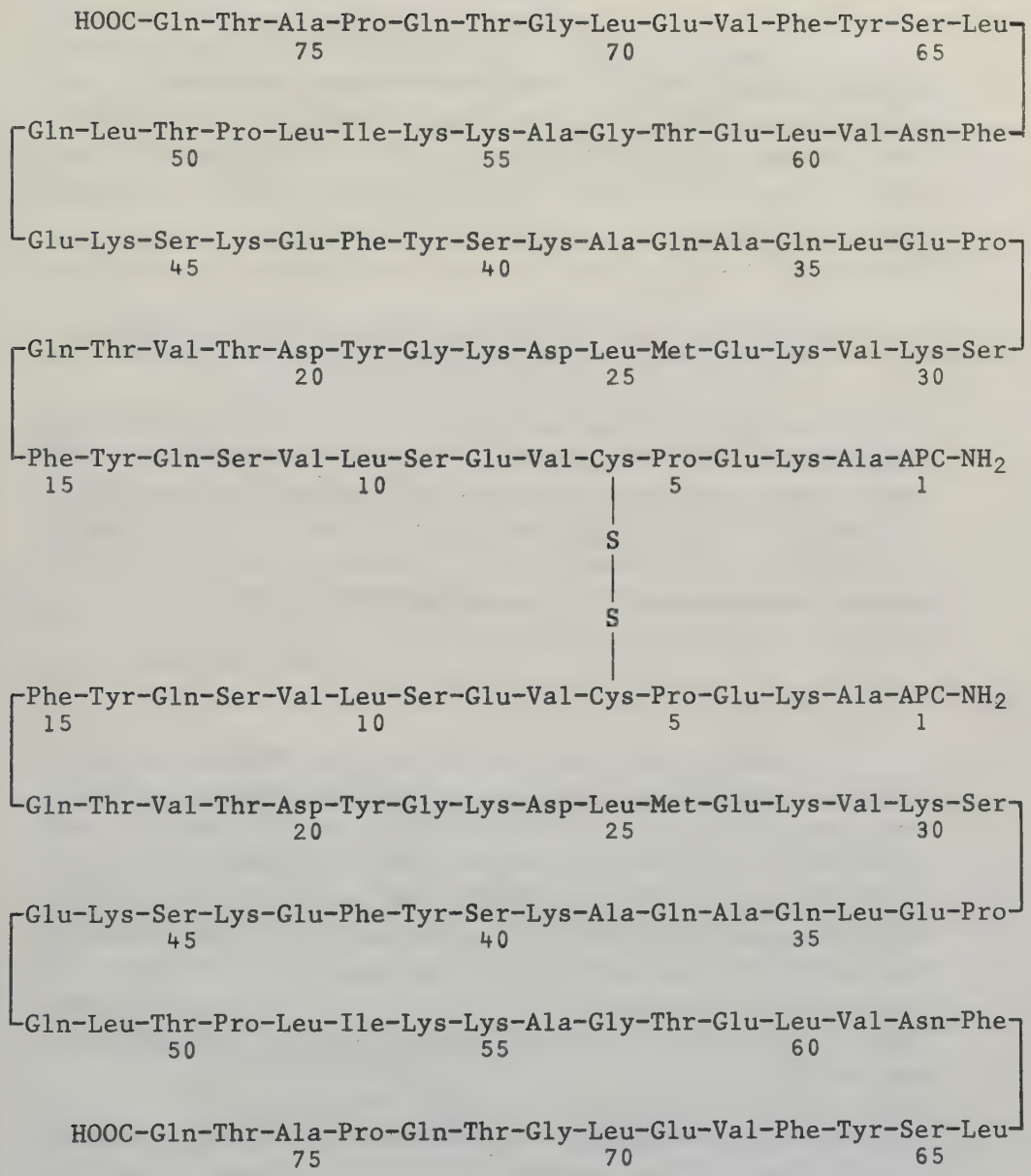


Fig. 6 - Séquence des aminoacides de l'apoprotéine A II (APC : acide pyrroglutamique)

L'apoprotéine A II (*) comporte deux chaînes polypeptidiques identiques de 77 aminoacides chacune et présente un poids moléculaire de 17.000 . Un pont disulfure relie les deux polypeptides et intéresse les molécules de cystéine n°6 (Brewer (36)). L'aminoacide N terminal est constitué par l'acide pyrrolidone α carboxylique et le C-terminal par la glutamine (fig.6) (**) .

2°- Apoprotéine A III ou Apoprotéine D ou "thin line" protéine D .

Elle a été isolée chez l'Homme (5) . Son poids moléculaire est de 20.000 et le groupe C- terminal est constitué par la sérine ; en outre, elle ne contient pas de cystéine et renferme de la glucosamine . Signalons que cette apoprotéine se trouve, à côté d'autres apoprotéines dans la Lp X . L'enchaînement des aminoacides dans cette apoprotéine n'a pas encore été établi .

3°- Apoprotéine B.

On n'est pas bien fixé sur sa masse moléculaire en raison de son insolubilité dans l'eau . Les chiffres obtenus, qui oscillent entre 8.000 et 275.000 (209,258), laissent penser qu'elle comporte un nombre important de sous-unités . La séquence de ses aminoacides n'a pas pu être déterminée, mais on pense qu'elle pourrait être voisine de l'apovitelline du jaune d'œuf de l'Emeu (oiseau coureur australien entre les Nandous et les Casoars), qui est bien connue (Dopheide et Inglis (66)) . On sait que la sérine est l'aminoacide C-terminal (237,232) et l'acide glutamique l'aminoacide N-terminal (245) .

(*) Appelée encore R-Gln-II

(**) Selon certains auteurs (235), l'aminoacide C-terminal de l'apoprotéine A II serait la thréonine.

4°- Apoprotéine C I (*) .

Elle est constituée par une chaîne polypeptidique simple de 57 résidus d'aminoacides avec la sérine comme aminoacide C - terminal et la thréonine comme aminoacide N - terminal (Jackson et coll. (126) , Shulman et coll. (255), (fig.7) .

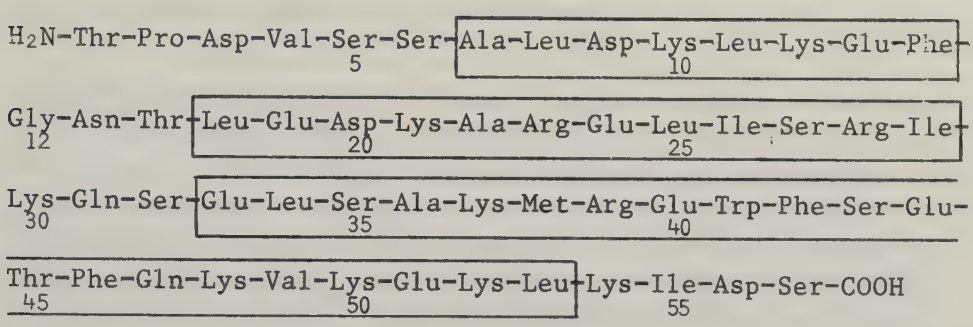


Fig.7 - Séquence des aminoacides de l'apoprotéine C I humaine. Les régions entourées correspondent aux segments amphipathiques (voir fig. 15a).

5°- Apoprotéine C II (**) .

Elle est constituée par une chaîne polypeptidique d'environ 100 aminoacides, dont la séquence n'a pas encore été entièrement établie ; l'acide glutamique est l'aminoacide C - terminal (4) .

6°- Apoprotéine C III (***) .

Elle renferme 79 aminoacides , dont l'enchaînement est connu . La sérine est l'aminoacide N - terminal et l'alanine l'aminoacide C - terminal (fig.8). Elle renferme, de plus, une copule glucidique, constituée de galactose, de galactosamine et d'acide sialique, liée par une liaison O-glycosidique à la molécule de thréonine n°74 .

(*) Appelée encore (R-Ser) - C I (122).

(**) Appelée encore (R-Glu) - C II.

(***) Appelée encore (R-Ala) - C III.

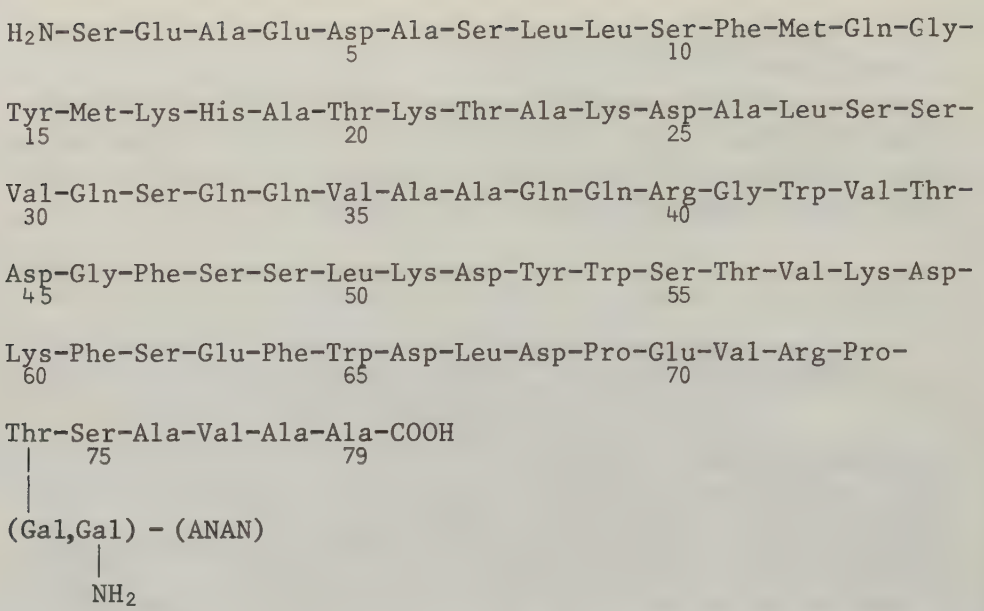


Fig.8 - Séquence des aminoacides de l'apoprotéine C III humaine. On notera la situation de la copule glucidique. ANAN : acide N-acétyl-neuraminique.

7°- Apoprotéine riche en arginine ou Apoprotéine E .

Elle a été isolée par Shore et Shore (252) de la fraction VLDL . Son poids moléculaire est de 33.000. Elle est exempte de cystine. Son aminoacide N - terminal est représenté par la lysine et son groupe C - terminal par l'alanine .

Les apoprotéines ont été isolées de diverses espèces : Homme, Bœuf, Porc, Rat, Chien, Lapin, primates, Saumon ...dans certains cas, il existe des variantes en fonction de l'espèce : ainsi par exemple, l'apoprotéine A II est un monomère dans la plupart des espèces contrairement à celle de l'Homme et du Chimpanzé .

Ces diverses apoprotéines ont fait l'objet de nombreuses études : notons en particulier leur comportement vis-à-vis de certains enzymes agissant sur les lipides sériques ; nous aurons l'occasion de revenir sur cette notion dans la deuxième partie de notre travail. Signalons que l'apoprotéine C II (Soutar et coll. (262)) active la

lipoprotéine lipase, tandis qu'au contraire, les apoprotéines C I et C III l'inhibent (Brown et Berginsky (38)) . Les apoprotéines C I (Fielding , Shore et Fielding (81)) et A III (Kostner (143)) activent la lécithine-cholestérol-acyl-transférase . Mais les recherches essentielles, pour cette première partie de notre travail résident en la détermination des sites actifs pour la fixation des lipides, point sur lequel nous reviendrons plus loin .

Comme nous le signalions plus haut, chaque fraction (caractérisée par électrophorèse ou par ultracentrifugation)est souvent constituée par plusieurs apoprotéines . Parmi celles-ci,on distingue celles qui se trouvent en quantité importante, les apoprotéines majeures , et celles qui, au contraire, ne se trouvent qu'en faible quantité, les apoprotéines mineures . Le tableau III, emprunté à Jackson, Morrisett et Gotto (134), rend compte de la composition des diverses fractions . Signalons cependant que cette composition ne saurait être considérée comme immuable . D'ailleurs, les auteurs qui ont étudié en détails les apoprotéines des diverses fractions signalent ça et là des apoprotéines, en quantités très faibles il est vrai, qui ne sont pas mentionnées dans ce tableau (voir à ce sujet (204)) .

(voir Tableau III, page suivante)

Tableau III

	Chylomicrons	VLDL	LDL	HDL	VHDL
Densité	< 0,95	0,95-1,006	1,006-1,063	1,063-1,210	1,210-1,250
Mobilité électrophorétique	départ	pré β	β	α	α
Constituants majeurs	Apo B Apo C I Apo C II Apo C III	Apo B Apo C I Apo C II Apo C III protéine riche en arginine (E)	Apo B	Apo A I Apo A II	Apo A I Apo A II
Constituants mineurs	Apo A I Apo A II	Apo A III Apo A I Apo A II		Apo C I Apo C II Apo C III protéine riche en arginine (E)	

E - STRUCTURE DES LIPOPROTEINES SERIQUES

L'application aux lipoprotéines purifiées de techniques physiques modernes, en particulier les spectres de diffraction de rayons X, la résonance magnétique nucléaire (*) , la mesure du dichroïsme circulaire, l'étude des micrographies électroniques, la spectrographie infra-rouge, les marqueurs de spin ou de fluorescence (**), puis la comparaison des résultats obtenus avec ceux ayant trait à des mélanges artificiels de constituants de ces molécules ont permis de renouveler nos conceptions sur la structure de chaque type de lipoprotéine .

Des techniques purement biochimiques sont venues parfaire les résultats des études physiques ; elles ont consisté, entre autres choses, à étudier l'action de divers enzymes (lipases, phospholipases, protéases) : si l'enzyme présente d'emblée une certaine activité, on peut supposer que son substrat occupe une position superficielle, si au contraire, l'enzyme se montre inactif, on peut supposer alors que son substrat occupe une position intérieure ;il convient alors pour le confirmer de détruire les constituants superficiels par des enzymes appropriés et d'observer ensuite une activité de l'enzyme précédemment étudié . L'action de divers réactifs spécifiques de groupements chimiques des protéines et des lipides (groupe amine, acide,sulfhydrile des protéines ; groupes acide phosphorique et amine quaternaire des phospholipides) a également été étudiée, afin de voir si ces groupes étaient superficiellement libres ou au contraire masqués .

Malgré le nombre considérable d'expériences réalisées et la haute qualité des résultats obtenus, bien des contradictions persistent encore, en particulier en ce qui concerne les interactions lipides-apoprotéines . Sans pénétrer dans le détail des techniques utilisées, qui ne rentrent d'ailleurs pas dans le cadre de ce travail, nous résumerons les travaux effectués et les conclusions auxquelles ils ont abouti pour chaque groupe de lipoprotéines .

(*) On trouvera un intéressant exposé général sur la résonance magnétique nucléaire dans l'ouvrage de Don H. Moore (185) et dans celui, tout récent, de Harris (113).

(**) Voir sur ce sujet le récent ouvrage de Norman (194).

1°- Chylomicrons et VLDL.

Les chylomicrons et les VLDL ont une composition et une structure assez comparables . Les VLDL présentent une certaine hétérogénéité, ainsi qu'on a pu le constater dans le tableau III. En plus des apoprotéines du type A et B, on a pu isoler l'apoprotéine C (105, 106) , dissociable en apopeptides C I , C II et C III (39, 40) ; ceux-ci représentent d'ailleurs la moitié de la partie protéidique des VLDL . Tous les apopeptides ont été bien identifiés par Shore et Shore (250, 251) . Cette fraction renferme, en outre, des résidus glucidiques .

Deux grandes séries de recherches ont été réalisées sur la structure des particules de VLDL, qui présentent une forme sphérique (197) . Vandenheuvel (312) estime qu'il existe un noyau constitué par un complexe lipoprotéine-eau et une couche superficielle qui occuperait une surface de 3,5 à 3,8 nm^2 et une épaisseur de 0,7 nm ; cette couche serait constituée par des protéines, qui, selon Gustafson (104), se trouveraient en quantité suffisante pour couvrir toute la surface de la particule . On a pu d'ailleurs calculer le nombre de résidus d'aminoacides situés en surface (327) ; ce nombre correspond parfaitement avec les calculs effectués en fonction de la surface . Entre le noyau et la couche superficielle existerait un espace de 2,2 nm où se trouverait la majeure partie des lipides.

D'autres auteurs (229, 230, 243) , après Zilversmit (328), envisagent un noyau lipidique neutre comportant les triglycérides et les esters du cholestérol, tandis que le cholestérol libre, les phospholipides et les protéines se trouveraient à la surface .

La stabilité relative des VLDL serait due surtout à la présence des apoprotéines C qui présentent une grande capacité de liaison avec les phospholipides (106) ; les lipides et les protéines seraient unis entre eux par des forces physiques . Les associations artificielles effectuées à l'aide d'ultrasons entre la phosphatidyl - choline et l'apolipoprotéine -alanine provenant de la VLDL et la comparaison avec la lipoprotéine naturelle laissent penser que, s'il existe des liaisons ioniques, elles ne jouent qu'un rôle minime(187) .

Dervichian et coll. (107) émettent des doutes sur l'existence d'une structure organisée dans les VLDL, après avoir noté que les lipides neutres étaient directement accessibles à la lipase, comme si on avait affaire à une émulsion . Si vraiment les lipides neutres forment le noyau de la molécule, il faut admettre alors que la lipase traverse la couche superficielle pour les atteindre, ce qui paraît assez douteux !

2°- LDL .

Beaucoup de recherches ont été effectuées sur cette fraction constituée en quasi-totalité par la β-lipoprotéine . Elle est la plus abondante parmi les lipoprotéines . La LDL 2 a été particulièrement bien étudiée : on admet grâce aux études mettant en œuvre la vitesse de sédimentation et la microscopie électronique (88, 209, 240) qu'elle se présente sous la forme d'une particule sphérique d'un diamètre de 22 nm (209,240) . Son poids moléculaire est compris entre 2,2 et 2,7 x 10^6 daltons (240) . L'apoprotéine B serait constituée de trois peptides différents (206) dont l'un d'eux serait particulièrement abondant (90 p. 100 de l'ensemble) . Signalons que, par la technique immunologique, il a été possible d'identifier dans la LDL de petites quantités d'apoprotéines A et C (154) .

Plusieurs modèles structuraux ont été proposés pour cette fraction : Pollard et coll. (208) , grâce à la microscopie électronique et aux résultats de l'attaque enzymatique par les phospholipases A et C, suggèrent qu'une partie de la surface de la particule est constituée par 20 sous-unités protéiques globulaires arrangées sur un dodécaèdre avec une structure icosaédrique (fig.9) ; les autres parties de la surface sont formées par des groupes polaires des phospholipides . Quant aux lipides neutres, ils formeraient un noyau à l'intérieur de la molécule (fig. 10) . Notons à ce sujet que les lipides neutres des LDL ne sont pas directement accessibles à l'action des lipases (107) .

C'est à une conception voisine de celle de Pollard et coll. qu'aboutissent les travaux réalisés par Badin et Denne (22) . Selon ces auteurs, la lipoprotéine serait constituée par un noyau

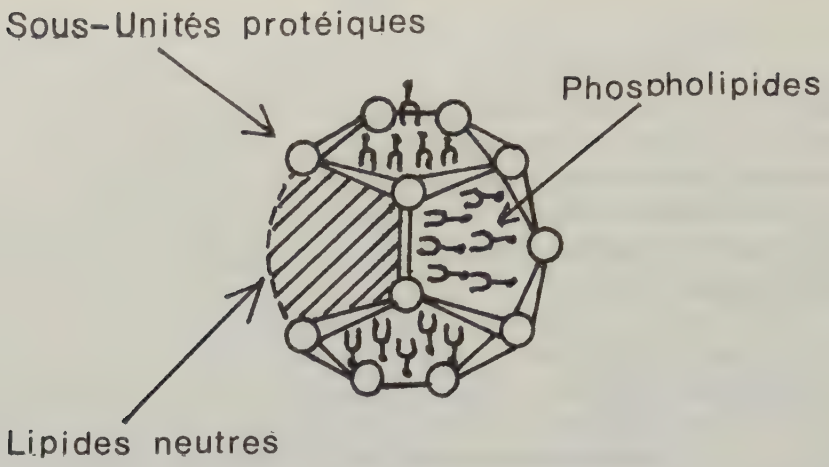


Fig. 9 - Modèle de LDL 2 selon Pollard et coll.

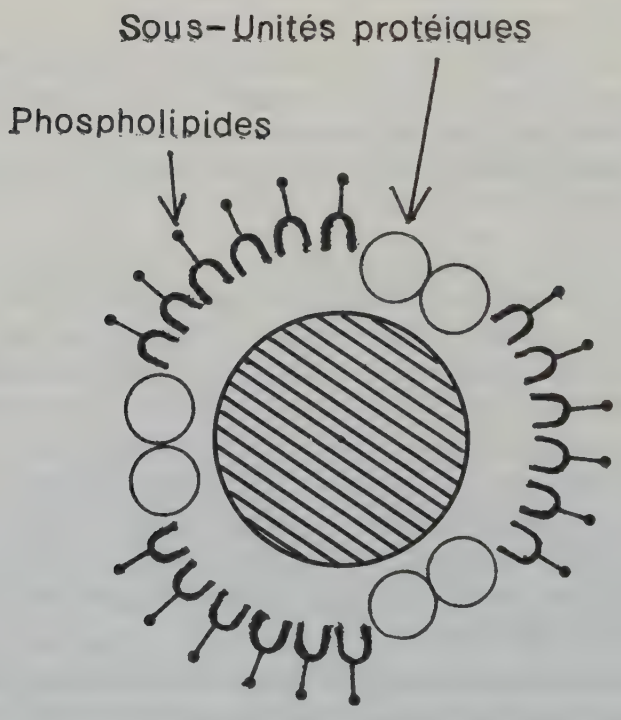


Fig. 10 - Perspective bidimensionnelle de la LDL 2 selon Pollard et coll.

central, renfermant les lipides neutres et les esters du cholestérol, et par une couche périphérique, sorte de "damier" , où alterne - raient le cholestérol libre, les phospholipides, et les apoprotéines, ces trois derniers groupes de substances formant à la surface un réseau particulièrement serré . Cette conception est fondée sur un certain nombre d'observations mettant en œuvre le digitonoside, la streptolysine , la fixation des colorants basiques, la microscopie électronique etc ... (voir 21) .

Mateu et coll. (183) ont apporté une importante contribution à la question en effectuant une étude par diffusion centrale des rayons X des solutions de LDL2 en fonction de la densité du solvant . Ils ont pu ainsi déterminer un profil radial de densité électronique qu'ils ont interprété en termes d'organisation moléculaire. Des résultats obtenus, complétés par la microscopie électronique , ils ont proposé un modèle dit en double couche, qui présente une certaine originalité en ce sens qu'il diffère des modèles présentés jusqu'alors et qui comportaient un noyau lipidique entouré de protéines (209, 240, 208) . La limite entre les deux couches est située à 6,5 nm du centre et le volume de la double couche est en parfait accord avec celui susceptible d'être occupé par la totalité des chaînes polyméthyléniques des phospholipides, celle des esters du cholestérol et du cholestérol libre .

Les mélanges d'esters de cholestérol et de phospholipides ne formant jamais une seule phase (238), même à température élevée et en présence d'eau, on admet que les molécules de protéines sont nécessaires à maintenir ensemble ces deux classes de lipides. Selon Mateu (182) , cette fonction pourrait être liée à une affinité spécifique de la protéine pour les esters de cholestérol . Dans leur schéma (fig. 11), ces auteurs représentent la chaîne latérale tournée vers l'extérieur . Un tout récent travail de Hara et coll. (112) prouve qu'il en est bien ainsi : ces auteurs ont montré, en effet, que des immunsérums spécifiques de la chaîne latérale du cholestérol réagissent directement avec la particule de LDL .

Comme on peut le constater dans la figure 11, chaque molécule de protéine se trouve donc associée à des esters de cholestérol ; les groupes polaires des phospholipides recouvrent l'interface de la région libre de la protéine . La présence d'un réseau bidimensionnel de molécules protéiques se trouve en accord avec

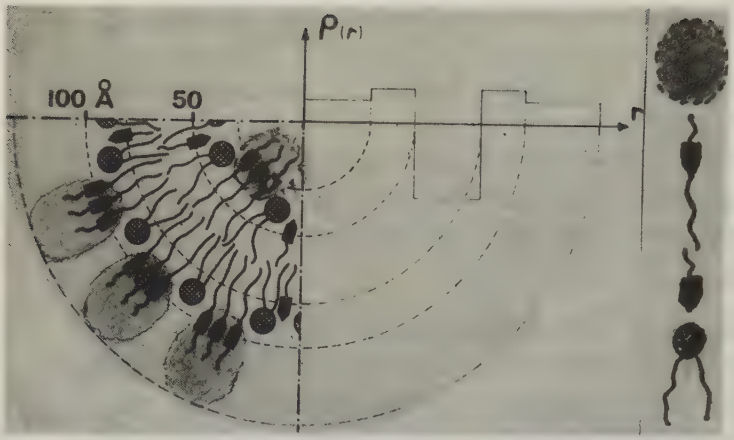


Fig. 11 - LDL 2, selon Mateu et coll.

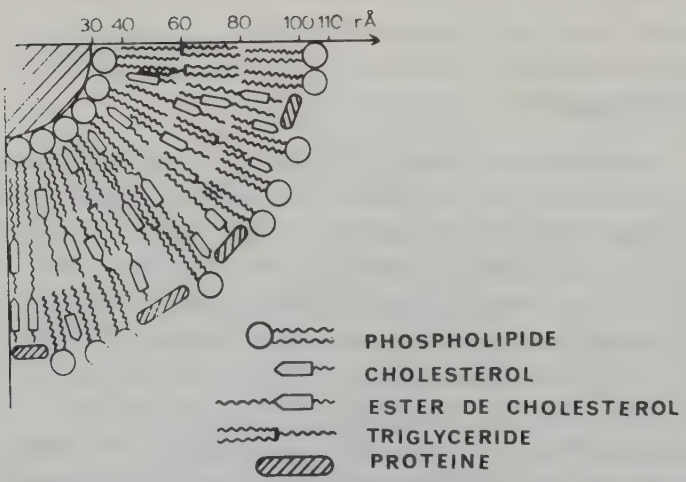


Fig. 12 - LDL, selon Finer et coll.

l'interprétation des clichés de microscopie électronique de Pollard (109, 208) . Ainsi , les molécules de phospholipides se trouvent en contact avec le solvant et expliquent les attaques des phospholipases A et C (209) . Dans son schéma, l'auteur ne représente pas les triglycérides , car il n'est pas encore fixé sur leur situation exacte.

Les rayons X ne permettent pas de renseigner exactement sur la structure du centre de la particule, mais les esters de cholestérol et les phospholipides étant présents de chaque côté de la double couche et, comme nous l'avons mentionné plus haut, les protéines étant nécessaires au maintien de la stabilité de ces deux lipides, les auteurs suggèrent la présence de protéines également à l'intérieur de la particule . Donc, la LDL contiendrait deux types de molécules de protéines, l'une mineure à l'intérieur, l'autre majeure dans la couche externe .

Les récentes conclusions de Finer et coll. (83) imaginent une représentation qui s'éloigne assez peu de celle de Mateu et coll. (183) et qui, en outre, apporte quelques compléments d'information . Utilisant la technique de résonance magnétique nucléaire, déjà mise en œuvre par Scanu et coll. (53, 267) , ces auteurs ont repris la question et ont étudié la situation des lipides et des protéines au sein de la LDL . Ils ont constaté qu'un tiers environ des groupes - $N^+(CH_3)_3$, appartenant donc à la choline, étaient inaccessibles aux solvants (*) . Cette conclusion est en parfait accord avec le fait que, sur les 550 molécules de phospholipides que renferme la particule de LDL, 200 seulement peuvent fixer l'aniline - 8-naphtalène - sulfonate . Ces groupes de surface sont séparés par des molécules de protéines . La LDL présenterait une structure triple entourant un noyau protéique (fig. 12) .

Toutes ces idées, aussi séduisantes soient-elles, ne sont cependant pas admises par tous . C'est le cas en particulier pour Kratky et coll. (148) , qui estiment que la particule de LDL est formée par un noyau lipidique de 19 nm de diamètre, renfermant les chaînes polyméthyléniques des phospholipides, tout le cholestérol (estérifié ou non) et les triglycérides ; ce noyau serait entouré par une couche polaire de 3,6 nm d'épaisseur, contenant la protéine et les groupes polaires des phospholipides .

(*) Ceci expliquerait le fait qu'une partie des phospholipides résiste à l'extraction par l'éther en présence de détergents divers.

Le désaccord entre cette conception et celle de Mateu doit être rattaché , selon ce dernier auteur, à des différences dans la façon de traiter les courbes expérimentales de diffusion centrale des rayons X de petits angles ; on trouvera une analyse détaillée de ces deux conceptions dans la thèse de Mateu (182) . Les travaux récents de Luzzati et coll. (166,276) laissent penser que d'intéressantes précisions seront prochainement fournies sur ce sujet.

De toutes façons, les auteurs précités sont tous d'accord pour admettre que des protéines occupent,en partie tout au moins, la surface de la particule . Cette notion a été confirmée tout récemment par les travaux de Chapman, Goldstein et Mills (54) , qui, par une technique utilisant la trypsine, ont prouvé qu'il en était bien ainsi .

Il est intéressant de signaler que, selon diverses conceptions, des groupes polaires de phospholipides sont libres et orientés vers le solvant . Cela est en accord avec les travaux de Dervichian et coll. (107) qui ont mis en évidence la fixation directe des polysaccharides -sulfates sur le groupe amine quaternaire . Une protéolyse préalable n'est pas nécessaire pour cette fixation . Comme on le verra, il n'en est pas de même en ce qui concerne les HDL .

Assez peu de travaux ont été effectués sur le type de liaisons unissant les lipides et les protéines dans les LDL . Selon les modèles réalisés par Mateu (182) , les forces ioniques n'entreraient pas en jeu . Il est très intéressant de rapprocher cette conclusion de celles émises par Tayeau (282) en 1945 . Etudiant les cénapses acido-précipitables de Machebœuf, constituées en grande partie, on le sait aujourd'hui,par des β-lipoprotéines, donc des LDL, cet auteur, grâce à des mesures d'électrotitration et des études en lame mince, avait justement conclu qu'il n'existait pas de liaisons ioniques entre lipides et protéines dans cette fraction et que les constituants devaient être unis probablement par des forces type Van der Waals .

3°- HDL.

Elles présentent une composition assez hétérogène. Contrairement aux LDL , qui sont constituées en presque totalité par l'apoprotéine B, les HDL comportent au moins cinq apoprotéines différentes (voir tableau III) ; de plus, on y rencontre, comme nous l'avons signalé plus haut, une copule glucidique(appartenant à l'Apoprotéine C III) .

Elles constituent les particules les plus petites parmi les lipoprotéines . Elles se subdivisent en deux sous-classes, ayant d'ailleurs des fonctions différentes (voir chapitre II) : les HDL2 et HDL3 dont les poids moléculaires sont respectivement 380.000 et 180.000 (234) (*) . Chacune de ces sous-classes a fait l'objet d'études analytiques et leur dissociation fournit 5 ou 6 sous-unités pour les HDL2 et 3 ou 4 pour les HDL3 (183) ; il semble cependant que le nombre de sous-unités soit en réalité plus grand : les études électrophorétiques et immunologiques laissent penser que les HDL2 comporteraient 8 à 10 apopeptides et les HDL3, 6 à 8 (183) (voir 204) .

Plusieurs modèles de structure ont été présentés ; ils sont fondés sur des expériences mettant en œuvre les spectres de rayons X de petit angle, la résonance magnétique nucléaire, le dichroïsme circulaire, la radioimmunologie, la fluorimétrie , etc ...

Dans les particules d' HDL2 comme dans celles d'HDL3 , il existe deux régions de densité électronique très différentes . HDL2 présente une région centrale ayant un rayon de 43 nm et une densité électronique assez faible . (312 e/nm^3) et une région externe (dite coquille extérieure), présentant un rayon de 14 nm et une densité électronique plus élevée (386 e/nm^3) (249,147) . Cette dernière région est en accord avec la présence d'une protéine et d'un phospholipide hydraté ; le pôle d'un phospholipide occupant environ 11 nm (202), on peut supposer qu'il est logé dans la région externe ; cette supposition se trouve en parfait accord avec les résultats d'expériences de résonance magnétique nucléaire (13,97) .

La présence, dans cette même région externe, des molécules d'apoprotéine est confirmée par diverses constatations : 90 p.100 des groupes ε-NH_2 de la lysine sont susceptibles de réagir directement,en particulier avec des dérivés succinylés (236) ; 75 p. 100 des résidus de tyrosine et 70 p. 100 des résidus de tryptophanne se trouvent en contact avec le solvant (139) (**) ; 90 p. 100 de

(*) HDL 3 dériverait de HDL 2 par élimination des lipides et perte de deux sous-unités protéidiques (234).

(**) Par mesures fluorimétriques.

l'apoprotéine se localisent bien dans cette zone (110) (*) . Enfin les phospholipides et les protéines de HDL sont respectivement accessibles aux phospholipases et aux protéases (107, 48) .

Un problème s'est particulièrement posé à propos des HDL : le mode d'union entre les phospholipides et les protéines de la couche externe . On pourrait penser , conformément à certaines conceptions anciennes (voir p.21) , à une interaction ionique entre les deux constituants . Les expériences de Stoffel et coll. (273) , faisant appel à la résonance magnétique nucléaire et à la mesure du temps de spin de relaxation (**) de noyaux enrichis en lipides, ne plaident pas en faveur d'un tel mode de liaison . Leur conclusion se trouve d'ailleurs confirmée par Assman et coll. (12), puis par Andrews et coll. (9) .

Assmann démontre que les groupes polaires des phosphatidyl-cholines (appartenant aux lécithines ou aux sphingomyélines) des liposomes soumis aux ultrasons présentent le même environnement hydrophile que ceux des lipoprotéines reconstituées ; or, dans ces dernières, il n'existe pas de liaisons ioniques . Il faut donc admettre que les interactions s'effectuent par des forces hydrophobes (274) .

Andrews a préparé, à l'aide d'ultrasons, des complexes constitués par des HDL de Porc et des dimyristoyl -lécithines : dans ces complexes, dont les caractéristiques et les propriétés ont été déterminées (14) et qui présentent une grande analogie avec les substances naturelles, il n'existe pas de liaisons fortes entre les deux constituants . De plus, des études en lames minces effectuées avec des complexes apoprotéines d'HDL -phospholipides et caséine -phospholipides permettent de conclure que les charges des groupes polaires et des phospholipides n'exercent pas une influence bien grande dans l'interaction lipides-protéines (203 , 118) .

(*) Par radio-immunologie.

(**) On trouvera un intéressant exposé sur cette technique dans l'ouvrage de Ingram (130).

Par ailleurs, Stoffel, grâce à de nouvelles mesures de temps de spin, a pu observer une interaction préférentielle de l'apoprotéine I avec la phosphatidyl-choline et de l'apoprotéine II avec la sphingomyéline . A l'aide de ces différentes notions, Stoffel a suggéré un modèle , dans lequel la surface est occupée moitié par les protéines, moitié par les groupes polaires des phospholipides et du cholestérol . Le noyau stéroïde des stérols serait situé dans le centre de la particule . La figure 13 rend compte de cette conception .

Dans leur schéma (fig. 13) , Stoffel et coll. représentent le cholestérol libre en surface et le cholestérol estérifié à l'intérieur de la particule . Les travaux tout récents de Hara et coll . (112) ne confirment cependant pas ce point de vue : ces auteurs ont préparé plusieurs immunsérums , dont certains (anti-acide étiocholénique) présentent une spécificité particulière pour les esters de cholestérol ; or, ils constatent (par une réaction d'hémagglutination passive) que ces immunsérums réagissent avec les HDL ; ils concluent donc que le cholestérol estérifié se trouve à la surface de la particule . Ils notent par ailleurs qu'un immunsérum anti-succinate de cholestérol, réagissant avec la chaîne latérale du cholestérol , se combine également avec la particule d'HDL, ce qui laisse suggérer que le noyau de cholestérol se trouve vers l'intérieur et la chaîne latérale de la particule vers l'extérieur . Hara et coll. notent encore qu'un sérum anti-acide phosphatidique réagit avec la particule, ce qui prouve que les phospholipides occupent une place superficielle, ce qui est conforme aux conceptions émises par tous les auteurs .

Une autre conception structurale a été avancée par Assmann et coll. (10) . Selon ces auteurs, l'apoprotéine flotterait, tel un iceberg, dans une mer lipidique . Ces auteurs proposent un schéma (fig. 14) dans lequel se trouvent représentés l'apoprotéine et les phospholipides (en perspective et en coupe) . Ce schéma n'est pas en accord avec les mesures effectuées à l'aide des rayons X .

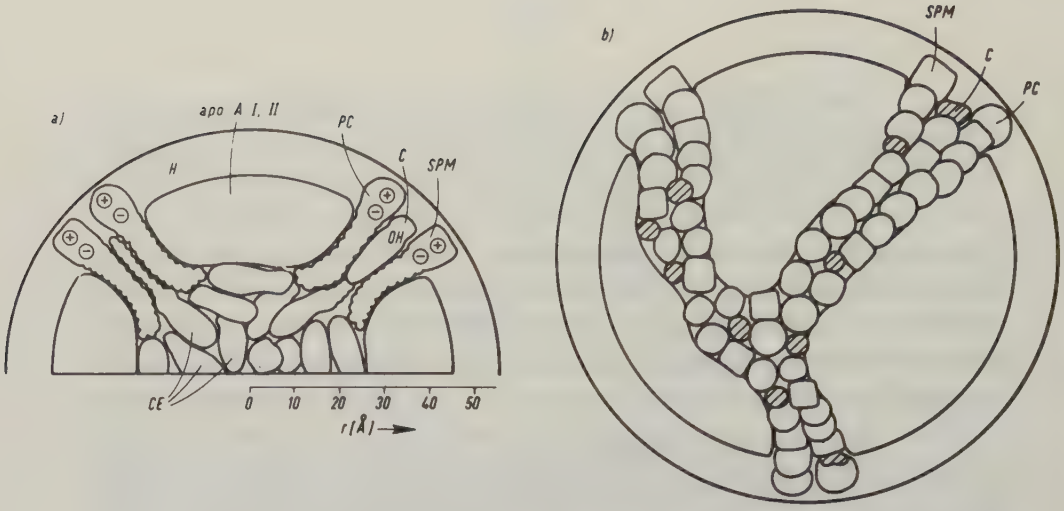


Fig. 13 - HDL selon Stoffel :

C : cholestérol, PC : phosphocholine,
CE : cholestérol estérifié, SPM : sphingomyéline

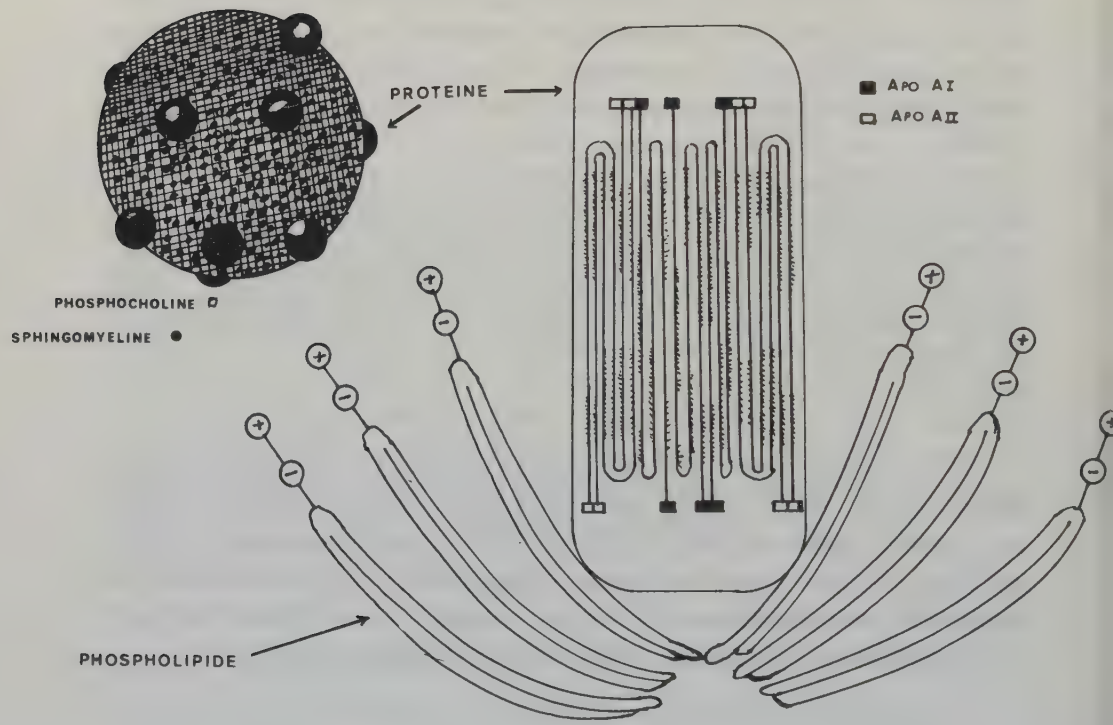


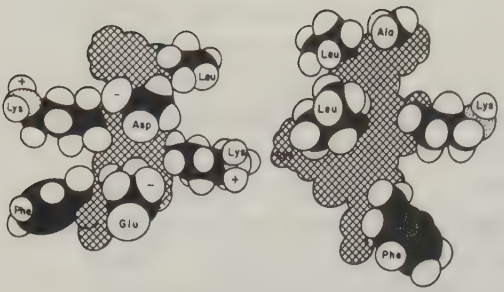
Fig. 14 - HDL selon Assmann et coll. (10)

Une troisième série de recherches adaptée (voir plus loin) à la structure des HDL mérite de retenir l'attention : ces recherches sont fondées sur la structure des apoprotéines . Comme les protéines en général, ces dernières présentent une structure partiellement hélicoïdale (voir 164), dont les modifications en fonction des lipides fixés peuvent fournir d'intéressants renseignements sur les possibilités de liaisons entre constituants . Segrest, Morrisett et Gotto (248) estiment que les apoprotéines, et en particulier les apoprotéines A II, C I et C III de certaines régions de l'hélice α , constituent les sites de fixation des phospholipides . Ces régions déterminées par la technique du dichroïsme circulaire (*) ne sont pas disposées uniformément le long de la chaîne spiralée (132, 263, 256) ; de plus, elles sont amphipathiques du fait qu'elles présentent d'un côté une face polaire et de l'autre une face apolaire . La face apolaire, relativement étendue, s'associe probablement avec les chaînes d'acides gras des phospholipides ; la face polaire comporte des groupes chargés négativement (aspartate, glutamate) orientés vers le centre et des groupes positifs (lysine, arginine) situés à la périphérie et susceptibles de s'associer à des ions lipidiques .

La figure 15 a schématise chacune des trois régions hélicoïdales amphipathiques de l'apoprotéine C I, la figure 15 b les deux faces polaire et apolaire de l'apoprotéine C III .

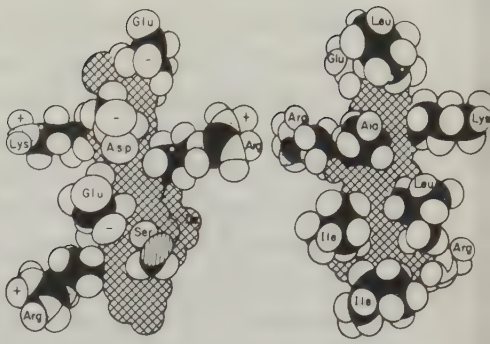
Voulant pousser plus loin leurs recherches, ces mêmes auteurs (248) utilisant les notions précitées ont construit des modèles à l'aide d'éléments atomiques fabriqués par CPK Ealing . Ils ont ainsi reproduit des segments hélicoïdaux d'apolipoprotéine -Ser(C I), d'apolipoprotéine -Ala (C III) et d'apolipoprotéine -Gln - II (A II). Ils ont cherché à associer les caractéristiques de l'hélice α et la structure amphipathique ; ils ont envisagé de fixer, sur les C α, des restes d'aminoacides variés et ils ont confié à l'ordinateur le soin d'indiquer les possibilités de structure répondant aux caractéristiques fixées . Ils ont discuté ces possibilités et ont pu ainsi obtenir des schémas, probablement très proches des structures naturelles (voir 248) .

(*) Chaque fois qu'un site fixe des phospholipides, on observe en dichoïsme circulaire une augmentation du "contenu" de l'hélice α , alors que rien de semblable ne se produit avec un site non réactif.



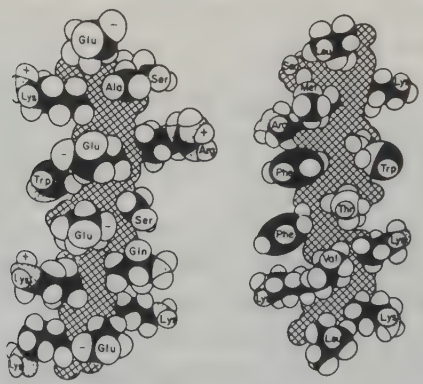
Face polaire Face apolaire

Résidus 7-14



Face polaire Face apolaire

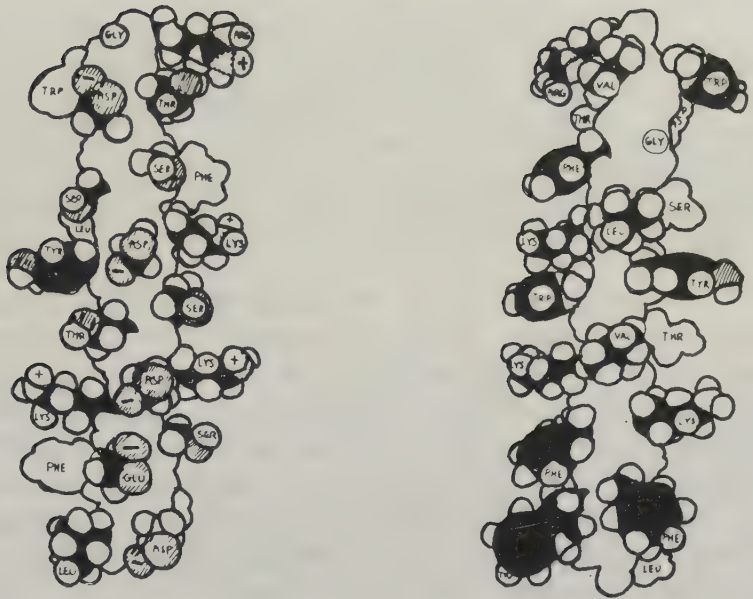
Résidus 18-29



Face polaire Face apolaire

Résidus 33-53

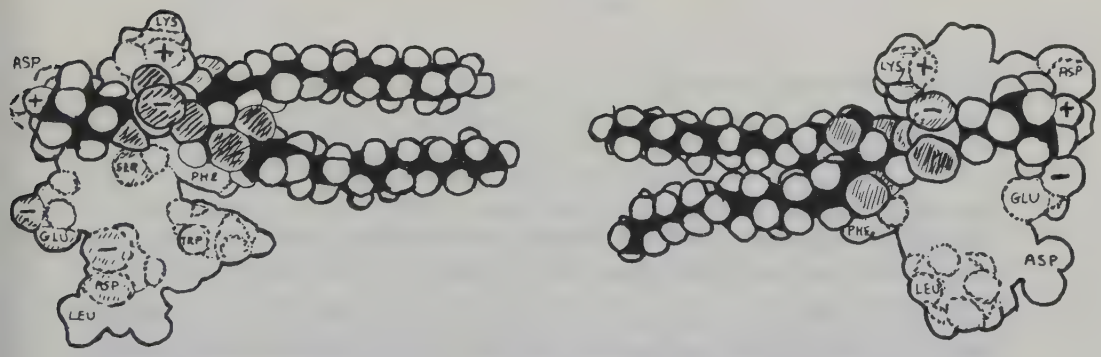
Fig. 15a - Représentation ,face polaire et face apolaire, de chacune des trois régions hélicoïdales amphipathiques de l'apoprotéine C I 'd'après 10).
On se reportera à la figure 7, où se trouvent encadrées les régions schématisées dans ces figures.



Face polaire Face apolaire

Résidus 40-68

Fig. 15 b - Faces polaire et apolaire de l'apoprotéine C III (255). Voir figure 8



a b

Fig. 16

En ce qui concerne la fixation des phospholipides sur ces sites, les auteurs envisagent un contact entre une chaîne latérale,dont la charge provient des résidus d'aminoacides, et des groupes de charge opposée des phospholipides . L'axe le plus long de la protéine serait orienté perpendiculairement aux chaînes hydrocarbonées des phospholipides ; ceci est d'ailleurs en accord avec les études de spectres de diffraction de rayons X (147,149) .

Les figures 16 a et 16 b proposées par les auteurs illustrent leur conception ; elles concernent l'interaction entre l'apoprotéine -Ala (apoprotéine C III), que l'on trouve aussi dans les VLDL, et les phospholipides . La figure 16 a représente une association électrostatique entre les premiers résidus lysyl et aspartyl,respectivement n°58 et 59 (voir p.32) du site actif de l'apoprotéine, et les groupes inverses de la phosphatidylcholine . La figure 16 b représente une association électrostatique entre le second résidu lysyl et le premier résidu glutamyl, respectivement n°60 et n°63(voir p.32) du site actif de l'apoprotéine . On sait effectivement que les résidus lysyl jouent un rôle particulier dans la liaison (133)(*).

(*) Cette conception envisage, entre autres choses, la possibilité d'une liaison entre un groupe basique du phospholipide et un groupe acide de l'apoprotéine. Elle trouve un argument dans les recherches de Dervichian et coll. (107). Ces auteurs ont prouvé, en effet, que les polysaccharides-sulfates ne peuvent se fixer sur les groupes amine quaternaire des phospholipides dans les HDL qu'après protéolyse (50). Donc ces groupements doivent être masqués, probablement combinés. Il n'en est pas de même pour les LDL, comme nous l'avons vu plus haut (45).

Il existe bien d'autres différences entre l'état des lipides des LDL et celui des HDL : rappelons simplement que l'éther en présence de savon extrait une grande partie des lipides des LDL, alors qu'il se montre inefficace vis-à-vis de ceux des HDL (20). Seuls les savons inversés (zéphirol), ou chlorure de benzyl-alkonium , peuvent permettre à l'éther d'extraire les lipides des HDL (20) ; on peut penser qu'en raison de leur caractère cationique, ils peuvent prendre la place des phospholipides, fixés aux apoprotéines par leur groupement cationique, et les libérer, facilitant ainsi leur extraction par l'éther.

Jakson, Morrisett, Gotto et Segrest (135) ont adapté leur concept à la structure des HDL . Dans leur schéma (fig. 17), les chaînes d'acides gras des phospholipides présentent une orientation perpendiculaire au segment α hélicoïdal de la protéine, c'est-à-dire à l'inverse de la conception d'Assmann et Brewer (10). Dans ce modèle, les carbones C_2 et C_4 de la chaîne d'acide gras des phospholipides réagissent avec la face hydrophobe de l'hélice et probablement avec la région hydrophobe des chaînes de lysine et d'arginine .

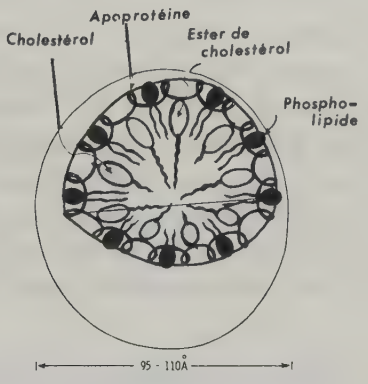


Fig.17 - HDL, selon Jackson et coll. (135)

Ces dernières hypothèses, qui sont fondées sur la structure hélicoïdale des protéines, ont renouvelé nos conceptions sur la structure des lipoprotéines .

On sait aujourd'hui que le schéma , proposé jadis par Dervichian (64) et qui a permis des recherches particulièrement fécondes à une époque où nos connaissances sur la structure des protéines étaient encore très rudimentaires, ne correspondent pas à la réalité structurale . Il convient néanmoins de souligner la prescience de Dervichian, qui avait permis de mieux comprendre l'état des lipides dans le sérum sanguin .

4°- Discussion sur les modes de liaison .

La structure des diverses lipoprotéines, nous venons de le voir, commence à être connue, quoi que l'hypothèse trouve encore une grande place dans les diverses conceptions proposées . Les types de liaisons entre lipides et protéines ne sont cependant pas encore parfaitement élucidés .

Si pour certaines fractions, chylomicrons, VLDL, l'existence de liaisons ioniques ne semble pas admise, le doute persiste encore en ce qui concerne les LDL et peut-être aussi les HDL .

La plupart des auteurs, et nous y avons fait souvent allusion dans les lignes qui précèdent, admettent que les phospholipides sont absolument nécessaires à l'intégration des lipides neutres dans les associations lipido-protéidiques ; les phospholipides formeraient le trait d'union entre apoprotéines et lipides neutres . Les récents travaux de Segrest et coll. (248) apportent encore des arguments expérimentaux à cette conception . Ces auteurs ont pu montrer, en effet, qu'en l'absence de phospholipides, les apoprotéines des HDL ne fixent que des quantités infimes d'esters de cholestérol .

Quelques auteurs cependant ne sont pas aussi formels et nous avons eu l'occasion, à propos de la structure des LDL , d'exposer les idées de Mateu et coll. (183) ; selon ces derniers , (voir fig. 12), il existerait une affinité spécifique de la protéine pour les esters de cholestérol . Signalons également à ce propos que Jensen , Aubertin et Tayeau (138) sont parvenus à former des complexes protéine-cholestérol libre ; de tels complexes peuvent, en effet, se former à la condition que le cholestérol se trouve sous une forme suffisamment dispersée ; les poly-oxy-éthylène-glycols permettent cette dispersion .

La notion sur le rôle essentiel des phospholipides dans l'édification des lipoprotéines avait été envisagée, il y a très longtemps par Dervichian (64), puis par Tayeau (283) ; ce dernier auteur avait montré, en effet, qu'il était possible d'extraire du sérum le cholestérol sans toucher aux phospholipides, mais qu'il n'était pas possible d'extraire du sérum les phospholipides sans entraîner automatiquement le cholestérol .

Si l'on conçoit sans difficulté le type de liaison susceptible de réunir le cholestérol, par exemple, et les phospholipides (voir thèse Cazenave (52)) , le doute persiste encore en ce qui concerne les liaisons unissant les phospholipides aux protéines ; selon certains, ces liaisons seraient électrovalentielles, envisageant une union entre un groupe positif ($-NH_3^+$) de la protéine et le groupe phosphorique des phospholipides ou encore un groupe négatif de la protéine ($-COO^-$) et le groupe ammonium quaternaire des phospholipides ou même quelquefois les deux, comme nous venons de le voir à propos des modèles réalisés par Segrest et coll. (248) ; selon d'autres, elles seraient purement physiques (union entre chaînes apolaires des protéines (restes de leucine, isoleucine, etc ... et chaînes apolaires d'acides gras des phospholipides).

Il est probable que tous ces types de liaisons doivent se rencontrer dans les diverses lipoprotéines, mais leur existence dans telle ou telle fraction n'est pasencore réellement bien démontrée .

II - RECHERCHES PERSONNELLES

Comme nous avons pu le constater, les grands progrès réalisés dans le domaine des lipoprotéines sont dûs, pour une grande part, au perfectionnement des techniques physiques, auxquelles nous faisons souvent allusion dans notre étude historique . Ainsi le problème de la structure des lipoprotéines quitte peu à peu le domaine des biochimistes pour gagner celui des physiciens .

L'équipement dont nous pouvions disposer étant relativement restreint et, par le fait même, nos ambitions limitées, nous avons réalisé que nous ne pouvions pas aborder certains aspects de la structure des lipoprotéines ; mais nous avons estimé, en revanche, que les techniques purement biochimiques, loin d'être épuisées, pourraient encore rendre des services et parfaire nos connaissances sur la question . Déjà , les travaux concernant l'action des enzymes spécifiques ont permis de localiser les substrats au sein de la particule (voir p. 44) . Nous avons donc pensé qu'en faisant agir graduellement certains détergents sur des lipoprotéines, nous pourrions, après analyse des substances extraites par l'éther, émettre des conclusions sur leur situation respective dans la particule .

Lorsque l'on étudie l'extraction des lipides sériques par l'éther en fonction de la quantité de détergent ajoutée au sérum, on obtient une courbe qui présente un maximum . La figure 18, empruntée à Machebœuf et Tayeau (176, 177), concerne un sérum de cheval, dont les lipides ont été extraits par l'éther en présence de quantités croissantes d'oléate de sodium ; la figure 19, empruntée aux mêmes auteurs , correspond à l'extraction du cholestérol total .

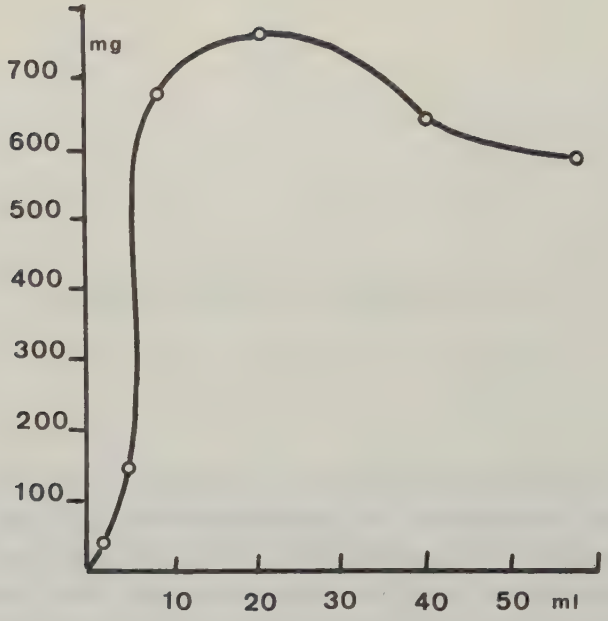


Fig. 18 - Courbe représentative des variations du poids des lipides extraits par l'éther en fonction de la quantité de savon ajoutée au sérum.

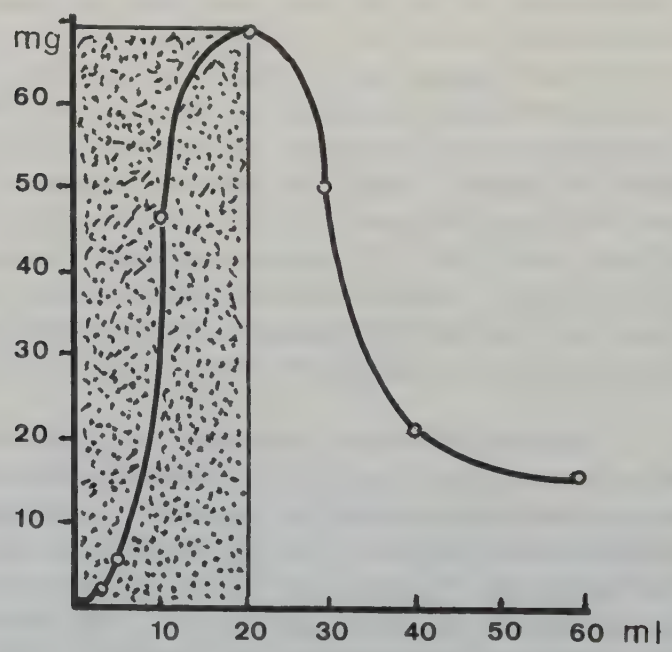


Fig. 19 - Courbe représentative des variations du poids du cholestérol extrait en fonction de la quantité de savon ajoutée au sérum.

Le but de notre travail a consisté à étudier la branche montante de la courbe, celle correspondant à la zone en pointillé dans la figure 19, afin de voir si les deux états du cholestérol, libre et estérifié, étaient extraits en même temps, ou bien si, au contraire, ils étaient extraits dans un ordre différent .

Dans une première partie, nous présentons nos essais préliminaires . Ceux-ci ont été effectués sur le sérum total, uniquement dans le but de mettre au point notre protocole expérimental et de sonder son intérêt éventuel .

Dans une seconde partie, nous mettons en œuvre des β -lipoprotéines d'Homme que nous avons préparées et dont nous avons testé l'homogénéité par diverses techniques; sur cette fraction, nous avons répété les essais primitivement effectués sur le sérum total . Dans une troisième partie enfin, nous discutons nos résultats expérimentaux et nous tirons les conclusions qui en découlent .

A - ESSAIS PRELIMINAIRES

Ceux-ci ont porté sur le sérum de Cheval, puis sur le sérum d'Homme . Les détergents utilisés ont été l'oléate de sodium et le saponoside de Sapindus (*) .

Les dosages du cholestérol total et du cholestérol estérifié sont effectués sur l'extrait éthéré, le taux du cholestérol libre est obtenu par la différence entre le taux du cholestérol total et celui du cholestérol estérifié .

L'extrait éthéré dissous dans du chloroforme est filtré et divisé en deux parts . Sur le résidu d'évaporation de l'une d'elles, on effectue la réaction de Liebermann-Burchardt et l'intensité de la coloration est comparée, à 640 nm, à celle d'une gamme étalon .

(*) Signalons que les saponosides de diverses origines n'agissent pas de la même façon sur le sérum sanguin (voir 28 6).

L'autre partie de la solution chloroformique est évaporée à son tour et sert au dosage du cholestérol estérifié, par une technique dérivée de celle de Forbes (87) . L'extrait d'évaporation est repris par un mélange à partie égale d'alcool et d'acétone auquel on ajoute une solution alcoolique de digitonoside. Après dix minutes de contact, on ajoute de l'hexane ; on agite . Il se forme deux phases : une phase alcoolo-acétonique et une phase constituée par l'hexane, qui a extrait le cholestérol estérifié , le complexe cholestérol libre-digitonoside étant resté dans l'autre phase . La phase constituée par l'hexane est recueillie, soumise à la centrifugation, afin d'éliminer les traces de complexes, puis évaporée à sec . Sur le résidu, on effectue la réaction de Liebermann (*) qui permet la détermination du taux de cholestérol estérifié .

1°- Essais sur le sérum de Cheval.

a) Action de l'oléate de sodium

Nous avons préparé trois ampoules à décanter dans les conditions décrites par Machebœuf (169) . Dans chacune de ces ampoules, nous avons placé 5 ml de sérum de Cheval recueilli aseptiquement . Nous avons ajouté au sérum des quantités variables d'une solution d' oléate de sodium à 21 p. 100 (soit volontairement assez concentrée), puis nous avons complété à un même volume à l'aide d'eau physiologique . Chaque mélange a été additionné de 10 ml d'éther . Après plusieurs agitations très prudentes, afin d'éviter la formation d'émulsion, nous avons laissé reposer les ampoules pendant 24 heures, puis nous avons prélevé la phase éthérée. Nous avons alors dosé sur chaque extrait le cholestérol total et le cholestérol estérifié : la différence entre les deux chiffres fournit le taux du cholestérol libre . Le tableau IV, qui correspond à 1 l de sérum traité, indique les résultats que nous avons obtenus dans deux

(*) Réaction effectuée avec 3,5 ml de chloroforme, 3,5 ml d'anhydride acétique, IV gouttes d'acide sulfurique. Lecture à 640 nm.

de nos expériences . Ces résultats prouvent que nous nous trouvons bien dans la région de la "courbe montante" (voir fig. 18), les quantités de cholestérol total extraites par l'éther en présence de quantités croissantes de savon vont, en effet, en augmentant .

Tableau IV

n° d'expérience et teneur du sérum en cholestérol(g/l)	oléate de sodium (g) ajouté à 1ℓ. de sérum	cholestérol total extrait (g)	cholestérol estérifié (g)	cholestérol libre (g)
N° 1				
Cholestérol total = 1,16	6	0,11	0,09	0,02
Cholestérol estérifié = 0,80	12	0,60	0,53	0,07
Cholestérol libre = 0,36	21	1,14	0,70	0,44
N° 2				
Cholestérol total = 1,08	8	0,33	0,27	0,06
Cholestérol estérifié = 0,71	12	0,50	0,39	0,11
Cholestérol libre = 0,37	16	1,06	0,69	0,37

Il est intéressant de comparer à présent le pourcentage du cholestérol estérifié par rapport au cholestérol total dans le sérum initial et celui des fractions extraites par l'éther. Le tableau V indique les valeurs de ces pourcentages .

La courbe en traits pleins de la figure 20 correspond à l'une des deux expériences précédemment mentionnées et choisies parmi un ensemble : elle montre que le cholestérol estérifié est extrait avant le cholestérol libre, puisque, dès l'addition d'une petite quantité d'oléate de sodium, les lipides extraits par l'éther sont une fois et demi plus riches en cholestérol estérifié, par rapport au cholestérol total, que le sérum initial . Pour des quantités d'oléate plus importantes, la proportion d'esters du cholestérol extraits par rapport au cholestérol total est moins importante . On peut donc conclure que le cholestérol estérifié "sort" plus vite que le cholestérol libre . Sur le même schéma, nous avons représenté par la courbe en tirets le cholestérol total extrait par l'éther .

Tableau V

Expériences	oléate de sodium (g) ajouté à 1 l de sérum	p. 100 du cholestérol estérifié par rapport au cholestérol total	p. 100 du cholestérol libre par rapport au cholestérol total
N° 1	sérum initial	68	32
	6	85	15
	12	89	11
	21	70	30
N° 2	sérum initial	65	35
	8	81	19
	12	78	22
	16	65	35

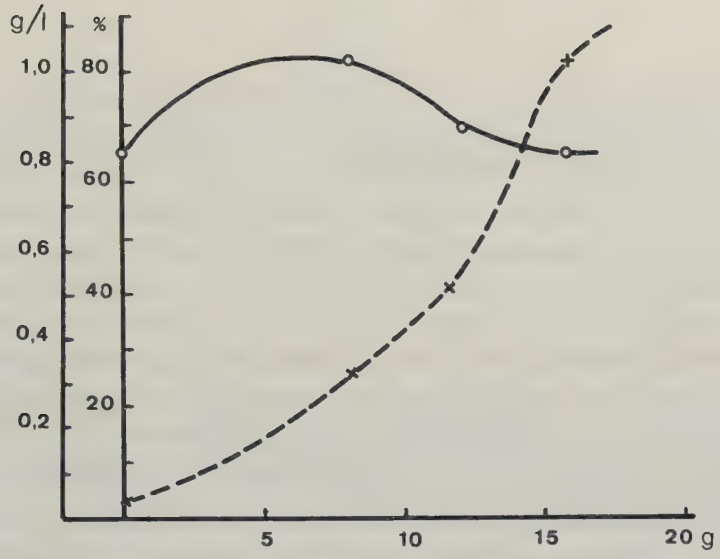


Fig. 20 - Courbes représentatives des variations du pourcentage de cholestérol estérifié par rapport au cholestérol total extrait du sérum par l'éther en fonction de la quantité d'oléate de sodium (g) ajoutée à 1 l de sérum. En tirets, courbe d'extraction du cholestérol total par l'éther en fonction de la quantité d'oléate de sodium ajoutée au sérum.

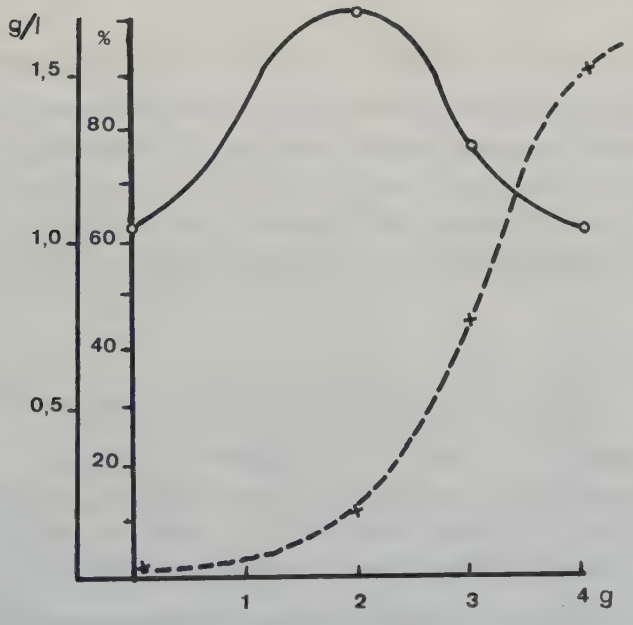


Fig. 21 - Courbe représentative des variations du pourcentage du cholestérol estérifié par rapport au cholestérol total extrait du sérum par l'éther en fonction de la quantité de saponoside (sol. à 10 p. 100) ajoutée au sérum. En tirets, courbe d'extraction du cholestérol total par l'éther en fonction de la quantité de saponoside ajoutée au sérum.

b) action du saponoside

Nous avons rappelé, dans la partie historique de notre travail, que le saponoside extrait de Sapindus Mukorosi permet l'extraction élective par l'éther de la totalité du cholestérol sérique (Tayeau (279)) . Si l'on trace la courbe représentative des variations du cholestérol extrait en fonction de la quantité de saponoside ajoutée au sérum, on note l'existence d'une concentration en saponoside pour laquelle l'extraction du cholestérol atteint un maximum . La courbe montre que jusqu'à cette concentration l'extraction du cholestérol est graduelle .

Nous avons donc étudié l'extraction du cholestérol estérifié et du cholestérol libre par l'éther en fonction de la quantité de saponoside ajoutée au sérum en restant en deça de la dose optimum . Les résultats que nous avons obtenus dans l'une de nos expériences sont consignés dans le tableau VI .

Tableau VI

Teneur en cholestérol du sérum initial (g/l)	saponoside (g) ajouté à 1 l de sérum	cholestérol total extrait (g)	cholestérol estérifié (g)	cholestérol libre (g)
Cholestérol total = 1,50	2	0,18	0,18	0
Cholestérol estérifié = 0,96	3	0,75	0,57	0,18
Cholestérol libre = 0,54	4	1,50	0,95	0,55

Comme précédemment, nous avons établi le pourcentage du cholestérol estérifié par rapport au cholestérol total extrait par l'éther . Le tableau VII indique la valeur de ces pourcentages.

Tableau VII

Saponoside (g) ajouté à 1 l de sérum	p. 100 du cholestérol estérifié par rapport au cholestérol total	p. 100 du cholestérol libre par rapport au cholestérol total
sérum initial	63	37
2	100	0
3	76	24
4	63	37

A ces résultats correspondent les courbes de la figure 21; cette fois encore, nous avons représenté sur cette même courbe le cholestérol extrait par l'éther . Nous constatons qu'avec le saponoside, le phénomène est encore plus net : le cholestérol estérifié est extrait avant le cholestérol libre .

2°- Essais sur le sérum d'Homme .

Nos expériences sur le sérum d'Homme ont été effectuées comme les précédentes ; seules ont varié les quantités de détergent ajoutées au sérum , afin de nous placer toujours dans la région où les quantités de cholestérol total extrait du sérum par l'éther vont en croissant .

a) action de l'oléate de sodium

Le tableau VIII indique les résultats que nous avons obtenus dans quatre expériences .

Tableau VIII

Expériences et teneurs en cholestérol du sérum initial (g/l)	oléate de sodium(g)ajouté à 1ℓ de sérum	cholestérol total extrait (g)	cholestérol estérifié (g)	cholestérol libre (g)
N° 1				
Cholestérol total = 2,17	8	0,62	0,60	0,02
Cholestérol estérifié = 1,50				
Cholestérol libre = 0,67	16	1,08	0,75	0,33
N° 2				
Cholestérol total = 2,50	4	0,02	0,01	0,01
Cholestérol estérifié = 1,70				
Cholestérol libre = 0,80	10	0,86	0,42	0,44
N° 3				
Cholestérol total = 2,29	6	0,11	0,10	0,01
Cholestérol estérifié = 1,74				
Cholestérol libre = 0,45	12	0,60	0,53	0,07
N° 4				
Cholestérol total = 4,00	8	0,37	0,26	0,11
Cholestérol estérifié = 2,30				
Cholestérol libre = 1,70	16	2,96	2,22	0,74

Le tableau IX mentionne les pourcentages de cholestérol estérifié par rapport au cholestérol total extrait par l'éther .

Tableau IX

Expériences	oléate de sodium (g) ajouté à 1 l de sérum	p. 100 du cholestérol estérifié par rapport au cholestérol total	p. 100 du cholestérol libre par rapport au cholestérol total
N° 1	sérum initial	69	31
	8	96	4
	16	80	20
N° 2	sérum initial	70	30
	4	50	50
	10	75	25
N° 3	sérum initial	75	25
	6	91	9
	12	88,5	11,5
N° 4	sérum initial	63	37
	8	72	28
	16	75	25

Nos résultats sont absolument superposables à ceux obtenus à partir du sérum de Cheval . Cette fois encore, nous constatons que le cholestérol estérifié est extrait avant le cholestérol libre .

b) action du saponoside

Le tableau X indique les résultats que nous avons obtenus dans deux de nos expériences .

Tableau X

N° des expériences et teneurs en cholestérol des sérums initiaux (g/l)	Saponoside (g) ajouté à 1 l de sérum	cholestérol total extrait (g)	cholestérol estérifié (g)	cholestérol libre (g)
N° 1				
Cholestérol total = 2,10	3	0,11	0,07	0,04
Cholestérol estérifié = 1,34				
Cholestérol libre = 0,76	5	1,42	0,96	0,46
N° 2				
Cholestérol total = 3,18	2	0,22	0,19	0,03
Cholestérol estérifié = 1,92				
Cholestérol libre = 1,26	6	1,01	0,69	0,32

Le tableau XI mentionne, comme précédemment, le pourcentage de cholestérol estérifié extrait par l'éther par rapport au cholestérol total . Une nouvelle fois, nous constatons que les premières additions de saponoside permettent à l'éther l'extraction d'une fraction de cholestérol dont le rapport cholestérol estérifié/cholestérol total est nettement plus élevé que celui du sérum initial .

Toutes nos expériences concordent parfaitement et permettent de conclure que les détergents, en l'occurence l'oléate de sodium et le saponoside de Sapindus, permettent à l'éther d'extraire du sérum le cholestéroi estérifié, préférentiellement au cholestérol libre .

Tableau XI

Expériences	Saponoside (g) ajouté à 1 l. de sérum	p. 100 du cholestérol estérifié par rapport au cholestérol total	p. 100 du cholestérol libre par rapport au cholestérol total
N° 1	sérum initial	63	37
	3	68	32
	5	67	32
N° 2	sérum initial	60	40
	2	86	24
	6	68	32

Comme nous l'avons signalé au début, ces expériences ne sont que préliminaires . Elles mettent en jeu le sérum total , mélange très hétérogène renfermant des lipoprotéines de types très différents . Les résultats obtenus ne représentent en somme que des moyennes . Il est possible que les diverses fractions lipoprotéidiques se comportent de façon différente .

Pour cette raison, nous avons réalisé une deuxième série d'expériences portant cette fois sur une fraction pure . Nous avons choisi les β-lipoprotéines et cela pour diverses raisons : d'abord parce qu'elles représentent la presque totalité des LDL ; or à l'époque où nous avons effectué nos recherches, nous ne disposions pas d'ultracentrifugeuse ; ensuite, parce qu'elles présentent une certaine homogénéité : elles sont presque entièrement constituées, en effet , par l'apoprotéine B ; enfin parce qu'elles ont été peut-être moins étudiées que les HDL .

B - ETUDE SUR LA β-LIPOPROTEINE

Burstein et coll. (42,43,44) ont réalisé toute une série de recherches sur l'isolement des β-lipoprotéines, en mettant en jeu soit l'héparine, soit les polyanions, tel le sulfate de dextrane par exemple . Nous avons adopté la technique utilisant l'héparine en présence de chlorure de magnésium (47) , dont nous indiquerons brièvement le principe .

1°- Préparation .

Cette technique consiste à ajouter au sérum du saccharose (afin d'augmenter la densité du milieu), de l'héparine et du chlorure de magnésium . Après un quart d'heure de contact, le mélange est centrifugé à 6000 g. Il s'est formé dans ces conditions une couche jaune orange qui surnage, que l'on recueille et que l'on dissout dans une solution de chlorure de sodium à 5 p. 100,additionnée de tampon tris HCℓ (0,02 M) à pH 7,7 . Les β-lipoprotéines sont alors précipitées au sein de cette solution à l'aide de chlorure de magnésium ; elles sont redissoutes dans le solvant salé et tamponné et précipitées à nouveau par le chlorure de magnésium (purification) . Le précipité final est alors dissous dans une solution de citrate de sodium à 10 p.100 . Cette solution qui présente une coloration jaune est dialysée d'abord contre le tampon tris, auquel il a été ajouté du chlorure de sodium (1 p.100), puis contre une solution de chlorure de baryum à 5 p.100 (élimination de l'héparine), avant d'être soumise à la centrifugation à + 4° C et de nouveau dialysée contre le tampon à pH 7,7 .

2°- Etude de la fraction obtenue .

Nous n'avons pas voulu mettre en œuvre cette β-lipoprotéine ainsi préparée sans la soumettre à diverses épreuves, afin de vérifier son degré de pureté . C'est ainsi que nous avons effectué

des expériences avec l'électrophorèse, l'immunoélectrophorèse mono et bi-dimensionnelle, l'ultracentrifugation et la focalisation ionique .

a) Electrophorèse

Nous avons effectué des électrophorèses sur cellogel en milieu tampon véronal à pH 8,6 et nous avons révélé, d'une part les protéines en utilisant le rouge ponceau, d'autre part les lipoprotéines grâce au rouge Ciba . La figure 22 montre que la fraction préparée forme une bande unique . Elle représente donc à l'électrophorèse une fraction homogène .

b) Immunoélectrophorèse

Elle a été effectuée avec un antisérum complet d'Homme (origine : Behring n° 2055 BC) et notre fraction . La technique de Scheidegger (241) a été utilisée . La révélation est effectuée avec le Noir Soudan . Les diagrammes obtenus (fig. 23) montrent que la fraction que nous avons préparée fournit un seul arc et présente ainsi un critère de pureté satisfaisant .

c) Immunoélectrophorèse bi-dimensionnelle

Nous avons mis en œuvre cette technique très sensible, en utilisant le procédé de Laurell (152) et Ressler (219), modifié par Rebeyrotte et coll. (217). L'opération est effectuée en deux temps : dans le premier temps, une électrophorèse de zone classique dans un gel d'agarose (à pH 8,6) est effectuée, dans le second temps, cette première migration est incluse dans un gel contenant l'immunsérum monospécifique anti β-lipoprotéine (provenance Behring n° 2585 F) ; une seconde électrophorèse à très faible voltage et perpendiculaire au premier transfert (217) est alors réalisée . Après lavage et séchage la révélation des protéines est réalisée à l'aide d'une solution d'amidoschwarz .

La figure 24 représente le diagramme d'une immunoélectrophorèse bi-dimensionnelle effectuée avec notre préparation. Elle montre que celle-ci est bien homogène .

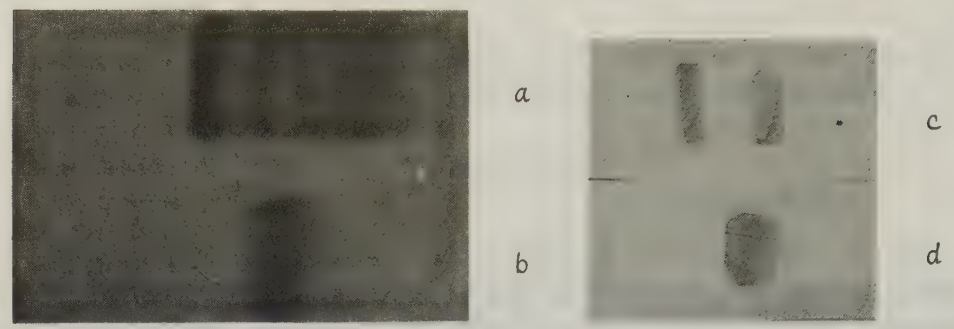


Fig. 22 - Diagrammes électrophorétiques

a) protéinogramme du sérum
b) protéinogramme de la fraction
c) lipoprotéinogramme du sérum
d) lipoprotéinogramme de la fraction

Fig. 23 - Immunoélectrophorèse :

a) sérum total
b) β-lipoprotéine

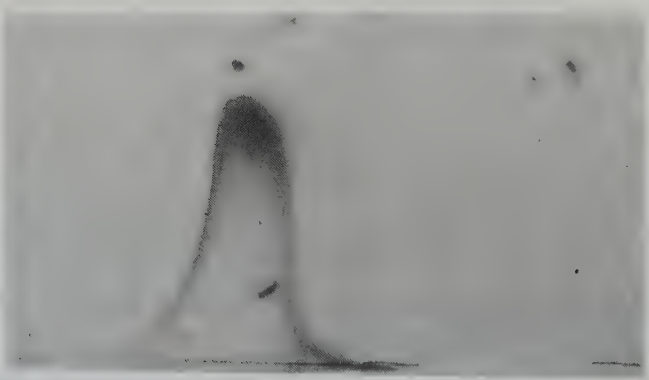


Fig. 24 - Immunoélectrophorèse bi-dimensionnelle de la β-lipoprotéine

d) Ultracentrifugation

Utilisant l'ultracentrifugeuse M S E , nous avons effectué une ultracentrifugation séquentielle selon la technique de Havel (119), en milieu bromuré . La β-lipoprotéine que nous avons préparée s'est concentrée entre les densités 1006 et 1063, ce qui correspond aux LDL , c'est-à-dire en gros aux β-lipoprotéines .

e) Focalisation ionique

Cette technique (voir 215) permet une identification précise des fractions et sous-fractions lipoprotéidiques. Nous indiquerons simplement quelques points de notre mode opératoire . Nous avons utilisé une colonne LKB de 110 ml réfrigérée à + 4° C et parfaitement siliconée (diméthyl-chlorosilane) . Le gradient de pH est réalisé au moyen d'une solution d'Ampholine LKB, pH 3,5 à 10, à 10 p. 100 en concentration finale . Le gradient de densité est obtenu avec une solution de saccharose Merck .

La migration est effectuée pendant quatre jours sous une tension régulée de 300 à 900 volts, l'intensité baissant progressivement de 6 à 1 mA . Après la migration, la colonne est reliée à un lecteur optique en UV à 280 nm et à un collecteur de fractions par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique fournissant un débit de 2 ml par minute . La colonne est alors vidée par le sommet . Les fractions recueillies, chacune d'un volume de 3 ml, font l'objet d'une mesure de pH sous agitation constante .

La focalisation de notre β-lipoprotéine a fourni un diagramme comportant un pic principal à pHi 4,4 et deux pics mineurs à pHi 6,3 et 6,6 respectivement (fig. 25) . Ce diagramme est en bon accord avec les observations de Scanu et coll. (233) et prouve que la β-lipoprotéine que nous avons préparée répond bien aux critères qui la caractérisent .

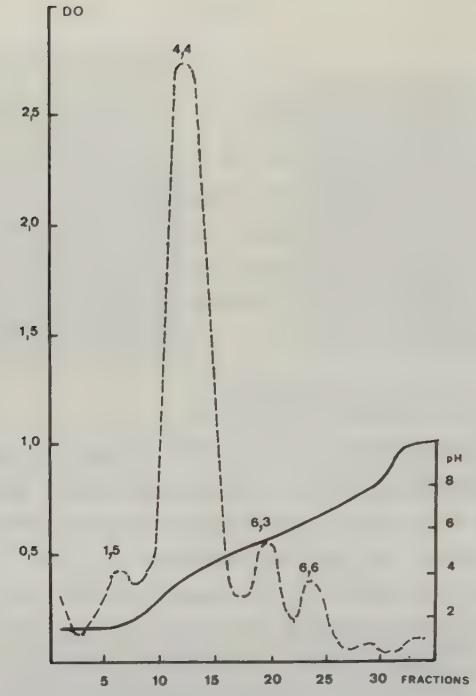


Fig. 25 - Courbe d'électrofocalisation :

en ordonnées : pH et densité optique (DO) ; en abcisses : nombre de fractions recueillies.; trait plein : pH ; tirets : densité optique.

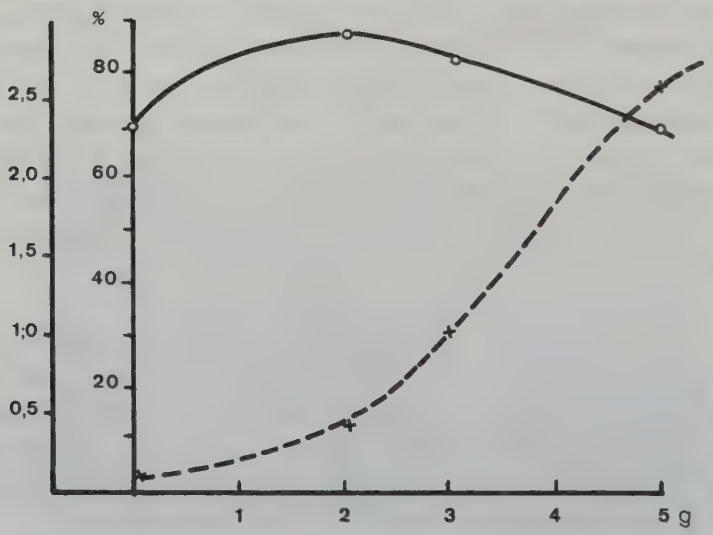


Fig. 26 - Courbe représentative des variations du pourcentage de cholestérol estérifié par rapport au cholestérol total extrait de la solution de β-lipoprotéine par l'éther en fonction du poids de saponoside ajouté au sérum.
En tirets : courbe d'extraction du cholestérol par l'éther en fonction de la quantité de saponoside ajouté à la solution.

3°- Expériences sur l'extraction du cholestérol .

Nous utilisons une solution de β -lipoprotéines dans l'eau physiologique, dont la concentration en lipides est , suivant les expériences, de 45 à 70 g par litre . En fonction de la teneur en cholestérol des fractions étudiées, nous faisons varier la quantité de détergent utilisée . Nous mettons en œuvre le mode opératoire précédemment décrit . Nous effectuons également deux séries d'expériences , la première avec l'oléate de sodium et la seconde avec le saponoside du Sapindus .

a) Action de l'oléate de sodium

Le tableau XII indique les résultats obtenus dans quatre expériences portant sur des β-lipoprotéines humaines .

(voir tableau XII, page suivante)

Tableau XII

Expériences et teneurs en cholestérol des fractions étudiées (en g par l .)	oléate de sodium (g) ajouté à 1 l. de la solution de β -lipoprotéine	cholestérol total extrait (g)	cholestérol estérifié (g)	cholestérol libre (g)
N° 1				
Cholestérol total = 8,5	5	0,36	0,34	0,02
Cholestérol estérifié = 5,5				
Cholestérol libre = 3,0	10	0,59	0,44	0,15
N° 2				
Cholestérol total = 24	5	2,81	2,01	0,8
Cholestérol estérifié = 17	10	3,37	2,5	0,87
Cholestérol libre = 7	12,5	10	6,9	3,10
N° 3				
Cholestérol total = 12	5	0,24	0,22	0,02
Cholestérol estérifié = 8,5				
Cholestérol libre = 3,5	15	3,37	2,8	0,57
N° 4				
Cholestérol total = 27	5	0,15	0,15	0
Cholestérol estérifié = 20,5				
Cholestérol libre = 6,5	10	0,41	0,34	0,07

Le tableau XIII rend compte de la proportion de cholestérol estérifié par rapport au cholestérol total extrait par l'éther en fonction de la quantité d'oléate ajoutée.

Tableau XIII

Expériences	oléate de sodium (g) ajouté à 1 l. de solution de β-lipoprotéine	p.100 de cholestérol estérifié par rapport au cholestérol total	p.100 de cholestérol libre par rapport au cholestérol total
N° 1	solution initiale	65	35
	5	92	8
	10	75	25
N° 2	solution initiale	70	30
	5	71	31
	10	74	26
	12,5	69	11
N° 3	solution initiale	70	30
	5	90	10
	15	71	29
N° 4	solution initiale	75	25
	5	100	0
	10	82	18

Toutes les expériences réalisées avec l'oléate de sodium présentent des résultats superposables . En présence d'une petite quantité d'oléate de sodium, l'éther extrait une quantité de cho - lestérol proportionnellement beaucoup plus riche en cholestérol estérifié que la solution initiale . Si la concentration en oléate croît, le cholestérol estérifié reste en proportion plus importante que dans la solution initiale, mais il arrive un moment où la proportion entre les deux formes de cholestérol tend vers celle de la solution initiale .

L'oléate de sodium possède donc la propriété de permettre à l'éther d'extraire de préférence le cholestérol estérifié au cholestérol libre .

b) Action du saponoside

Nous exposerons l'une de nos expériences effectuée avec ce détergent . Nous tenons compte ici encore de la teneur en cholestérol de la solution pour fixer les quantités de saponoside à mettre en jeu .

Le tableau XIV indique les résultats que nous avons obtenus et le tableau XV rend compte de la proportion de cholestérol estérifié par rapport au cholestérol total extrait par l'éther en fonction de la quantité de saponoside ajouté .

Tableau XIV

Teneur de la solution initiale en cholestérol (g par litre)	Saponoside (g) ajouté à 1 litre de solution de β -lipoprotéine	cholestérol total extrait (g)	cholestérol estérifié extrait (g)	cholestérol libre extrait (g)
Cholestérol total = 2,7	2	0,41	0,30	0,11
Cholestérol estérifié = 1,8	3	1,13	0,91	0,22
Cholestérol libre = 0,9	5	2,62	1,80	0,82

Tableau XV

Saponoside (g) ajouté à 1 litre de solution de β -lipoprotéine	p.100 de cholestérol estérifié par rapport au cholestérol total	p.100 de cholestérol libre par rapport au cholestérol total
Sérum initial	70	30
2	87	13
3	81	19
5	69	31

Avec cette expérience, nous obtenons une courbe qui met bien en évidence l'extraction préférentielle du cholestérol estérifié (fig. 26) .

Donc, qu'il s'agisse de l'oléate de sodium ou du saponoside, l'extraction par l'éther du cholestérol estérifié précède celle du cholestérol libre .

C - DISCUSSION

Lorsque l'on examine nos résultats expérimentaux, on est frappé d'emblée par la similitude qui existe entre ceux portant sur le sérum total et ceux qui concernent la β -lipoprotéine . Cela n'a rien d'étonnant : le sérum sanguin renferme trois principales lipoprotéines à l'électrophorèse : les β-lipoprotéines, correspondant aux LDL, les pré β-lipoprotéines, correspondant aux VLDL et les α -lipoprotéines, correspondant aux HDL .

Les pré β-lipoprotéines sont très peu abondantes dans le sérum normal comparativement aux β -lipoprotéines . On peut donc

considérer en gros deux fractions principales : les β-lipoprotéines et et les α -lipoprotéines . Or, il a été démontré (Ayrault-Jarrier , Martinet et Polonovski (20)) que l'éther n'extrait aucun lipide des α -lipoprotéines additionnées d'oléate de sodium (*) .

Le phénomène observé correspond donc pratiquement aux β -lipoprotéines ; il n'est donc pas étonnant que les résultats obtenus avec la β-lipoprotéine soient superposables à ceux qui concernent le sérum total .

Peut-on expliquer maintenant la raison pour laquelle le cholestérol estérifié est extrait avant le cholestérol libre ? Nous proposerons deux hypothèses pour expliquer cette constatation .

1°- La première est fondée sur les travaux de Mateu et coll. (182) . Selon ces auteurs (voir p.39), la zone superficielle de la molécule comporterait des groupements polaires des phospholipides, mais aussi des complexes protéines-esters de cholestérol ; le cholestérol libre occuperait une place moins superficielle . Si l'on adopte les conclusions de Ayrault-Jarrier (18) , selon lesquelles l'extraction d'un lipide donné serait conditionnée par la formation de micelles détergent-lipoprotéines, on peut admettre que, dans le cas qui nous intéresse, il se formerait un complexe entre l'oléate de sodium et la lipoprotéine la plus superficielle, c'est-à-dire le complexe oléate de sodium-protéine-ester du cholestérol; l'éther extrairait alors le lipide de ce complexe , c'est-à-dire l'ester du cholestérol .

2°- La seconde est fondée sur les travaux de Badin et Denne (22) . Selon ces auteurs, la particule de β-lipoprotéine comporterait un noyau central renfermant les lipides neutres, parmi lesquels les esters du cholestérol, tandis que la périphérie serait constituée par un réseau comprenant les phospholipides, le cholestérol libre et les apoprotéines . Cette conception est en parfait accord avec les idées de Cazenave (52), selon lesquelles le cholestérol libre présente plus d'affinité pour les phospholipides que le cholestérol estérifié, en raison de son oxhydrile alcoolique (liaison hydrogène entre les deux constituants) . Les complexes cholestérol libre-phospholipides ont d'ailleurs fait l'objet de stéréomodèles de la part de Finean (82) , de Vandenheuvel (313)(fig. 27).

(*) Seuls les détergents cationiques (zéphirol) permettent l'extraction de lipides par l'éther.

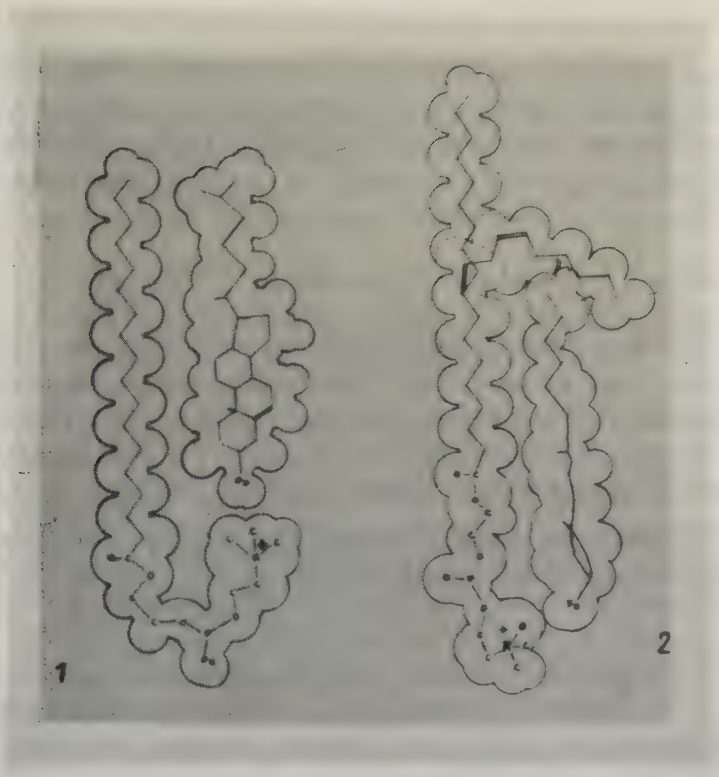


Fig. 27

1 : modèle de Finean
2 : modèle de Vandenheuvel

Lorsque l'on ajoute le détergent, celui-ci forme avec le complexe cholestérol-phospholipide une association ternaire: cholestérol libre-détergent-phospholipide . Cette association modifie considérablement la structure externe de la micelle ; il se fait un véritable éclatement de la zone externe , qui provoque une rupture de la zone hydrophile entourant la micelle, laissant ainsi apparaître une partie lipophile . Le cholestérol libre étant bloqué dans l'association ternaire, le solvant organique pénètre dans la micelle par la partie lipophile et extrait le cholestérol qui, à cause de son OH bloqué , n'a pas pu participer à l'association , c'est-à-dire le cholestérol estérifié .

Ces deux interprétations sont opposées : elles admettent bien toutes deux la formation d'un complexe, mais, tandis que dans le premier cas le solvant extrait les lipides du complexe, dans le second cas au contraire, il extrait les autres lipides . De nouveaux travaux seront nécessaires pour trancher le débat .

Conclusions du Chapitre I

Après avoir rappelé brièvement quelques notions sur les lipides et sur les protéines sériques et leur fractionnement, nous avons décrit les principales recherches effectuées sur les associations lipoprotéidiques du sérum sanguin .

Ces recherches peuvent être divisées en trois périodes, qui s'interpénètrent les unes avec les autres :

1°- De 1867 à 1946 -

Au cours de cette période, le problème de la solubilité des lipides sériques a été posé , les associations lipido-protidiques ont été découvertes (Machebœuf) et des hypothèses sur le mode d'union des lipides et des protéines ont été échafaudées .

2°- De 1943 à 1960 -

Au cours de cette deuxième période, le fractionnement des lipoprotéines a été effectué, d'abord par électrophorèse (isolement des chylomicrons, des pré- β -lipoprotéines, des β-lipoprotéines et des α-lipoprotéines), ensuite par ultracentrifugation (isolement des chylomicrons, des VLDL, des LDL et des HDL auxquelles sont venues s'ajouter les VHDL) .

Les rapports entre ces deux types de fractionnement ont été établis .

3°- De 1960 à nos jours -

Au cours de cette troisième période, les apoprotéines (constituants des lipoprotéines) sont isolées et identifiées . L'étude de la structure des diverses lipoprotéines bénéficie de techniques physiques (résonance magnétique nucléaire, dichroïsme circulaire,

rayons X de faible angle, etc..) et des schémas sont proposés pour les divers types de lipoprotéines . Le type de liaisons unissant les divers lipides et les apoprotéines entre elles a fait l'objet de beaucoup de recherches, mais le problème n'est pas encore parfaitement résolu .

Nous avons décrit ensuite nos recherches personnelles , dont le but principal était de mettre en évidence le comportement différent des deux formes de cholestérol , libre et estérifié, au sein des associations lipidoprotéidiques . Pour cela, nous avons étudié l'extraction du cholestérol sérique par l'éther en présence, d'abord d'oléate de sodium, ensuite du saponoside du Sapindus . Nous avons tout d'abord effectué des essais préliminaires sur le sérum total, puis des essais sur une β-lipoprotéine, que nous avons préparée et dont, par diverses techniques biochimiques et physiques, nous avons testé la pureté . Nous avons pu montrer ainsi que, le sérum et la β-lipoprotéine en présence de ces détergents, livrent à l'éther le cholestérol estérifié avant le cholestérol libre .

A la lumière de nos constatations, nous avons apporté des arguments à l'hypothèse de Mateu et coll. sur la structure des LDL .

CHAPITRE II

LE METABOLISME DES LIPOPROTEINES SERIQUES

Nous sommes amenés très souvent à séparer les uns des autres des phénomènes biologiquement indissociables . L'étude du métabolisme intermédiaire, divisée dans tous les ouvrages classiques en métabolismes glucidique, lipidique et protidique en est une illustration . Opérer ainsi constitue une nécessité pédagogique, au risque ensuite de traiter isolément les interconversions . Sans cette précaution, les phénomènes risqueraient d'être difficilement compréhensibles .

L'étude du métabolisme des lipoprotéines sériques doit, il nous semble, relever du même processus et c'est la raison pour laquelle nous avons traité séparément la biosynthèse et le catabolisme . Dans bien des cas pourtant, les deux phénomènes se confondent : la biosynthèse des LDL ,par exemple,est confondue avec le catabolisme des VLDL .Les exemples du même type ne manquent pas !

Dans ce chapitre, nous traiterons donc le métabolisme des lipoprotéines sériques,avant d'exposer nos recherches personnelles sur l'intégration d'acides gras au sein des lipoprotéines et sur le comportement à l'incubation d'une lipoprotéine .

I - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A - BIOSYNTHESE DES LIPOPROTEINES SERIQUES

Le problème de la biosynthèse des lipoprotéines a suscité de très nombreuses recherches . Malgré cela, beaucoup d'inconnues persistent encore ! Cette biosynthèse ne résulte pas, comme on le croyait jadis, du simple accolement des substances entrant dans leur constitution . Il est certain, en effet, que des liaisons se produisent, non pas toujours entre les constituants complètement formés, mais souvent entre leurs précurseurs . Le problème de la synthèse des lipoprotéines se trouve donc étroitement lié à celui de la biogenèse de ses constituants, c'est-à-dire des protéines, des acides gras et des divers alcools des lipides ....

Une question aussi vaste ne saurait évidemment prendre place dans cette thèse; aussi admettrons-nous comme connue la biosynthèse de ces constituants (*) .

Les premières tentatives tendant à expliquer le mécanisme de formation des lipoprotéines ont été réalisées in vitro et ont fait l'objet d'hypothèses intéressantes, certes, mais souvent éloignées de la réalité . Par ailleurs, un certain nombre de travaux ont consisté à incorporer au sein des associations lipido-protéidiques diverses substances lipidiques ; ces travaux ont eu généralement pour but de fournir des explications aux diverses inconnues qui persistent encore sur la question . Les recherches que nous avons effectuées sur ce point et dont l'exposé fera l'objet d'une partie de ce chapitre, entrent dans le cadre de ces travaux .

(*) voir, à ce sujet, la revue de Infante (128), celle de Jackson et coll. (134) et celle de Polonovski (211).

Nous rappellerons tout d'abord les premières tentatives de synthèse des associations lipido-protéidiques, puis nous exposerons les données actuelles sur la biogenèse des diverses lipoprotéines . Nous exposerons enfin nos principales connaissances sur le catabolisme des lipoprotéines .

1°- Premières tentatives sur la synthèse de lipoprotéines .

Nous mentionnerons simplement pour mémoire les travaux de Mayer et Terroine (184), White (320), Hattori (116), qui avaient préparé des complexes formés de lipides et de protéines ; mais ces complexes se montraient très différents des lipoprotéines naturelles (170) .

Il nous semble que le premier travail relatif à la formation d'associations lipido-protéidiques, vraiment comparables à celles du sérum, soit dû à Machebœuf et Perrimond-Trouchet (172, 173) . Ces auteurs ont supposé que les lipoprotéines se formaient dans le foie et que les sels biliaires devaient jouer un rôle essentiel dans l'association des deux constituants . Pour leur démonstration, les auteurs préparent tout d'abord des complexes savons-sels biliaires en s'inspirant des travaux de Von Kuthy et Verzar (314). Grâce à un marquage du savon à l'aide de brome (utilisation du dibromostéarate de sodium), ils constatent que ces complexes ne dialysent pas et que la quantité de savon et de sel biliaire traversant le dialyseur est pratiquement négligeable . Ils ajoutent ensuite, au complexe formé, des protéines sériques (en l'occurence les protéines de sérum de cheval, privées des euglobulines) . Ils notent alors que, dans ces conditions, les sels biliaires traversent la membrane: les savons se fixent sur les protéines en formant, au pH du milieu (la dialyse amène une baisse du pH qui se stabilise au pH isoionique moyen des protéines, soit pH 5,8 environ), des complexes protéines-acides gras . Selon les auteurs, les protéines ont libéré le sel biliaire de son attache avec l'acide gras en se combinant à sa place avec ce dernier . Les "cénapses" protéines-acides gras ainsi formées présentent les caractéristiques des cénapses naturelles (solution parfaitement limpide, stabilité à pH 6, résistance des acides gras à l'extraction par l'éther, etc ...) .

Machebœuf et Perrimond-Trouchet concluent que, dans l'organisme, les lipoprotéines doivent se former de la même façon: dans le sang de la veine porte se trouvent à la fois des protéines, des acides gras et des sels biliaires et l'on peut penser que le foie, qui élimine ces derniers par la bile, joue dans le processus le rôle que remplit la membrane dialysante dans les expériences in vitro . Les auteurs ajoutent qu'une fois les acides gras soudés aux protéines par leur chaîne polyméthylénique, leur fonction acide est orientée vers la phase aqueuse ambiante et l'organisme peut y combiner du glycérol ou un stérol par exemple de façon à transformer in situ les acides gras en leurs esters, les lipides et, par suite, les cénapses protéines-acides gras en cénapses protéines-lipides (voir 201) .

2°- Biogenèse des diverses lipoprotéines.

La biogenèse des diverses lipoprotéines du sérum sanguin constitue un problème extrêmement complexe , qui, nous l'avons signalé plus haut, s'intègre, partiellement tout au moins, dans celui du catabolisme . De nombreuses inconnues persistent encore sur cette question et l'hypothèse est loin de jouer un rôle négligeable .

D'intéressants résultats ont pu cependant être obtenus grâce à diverses techniques : perfusion de foie isolé, synthèses effectuées sur des particules subcellulaires (55), cyto-autoradiographie associée à la microscopie électronique (269, 270) .

Le foie a été longtemps considéré comme le site exclusif de la formation des lipoprotéines, mais on sait depuis les travaux de Roheim et coll. (223) que l'intestin est également un lieu de la biosynthèse : 10 p. 100 des VLDL de l'organisme, par exemple, se forment dans l'intestin (323) .

a) Chylomicrons

Ces particules prennent naissance dans l'intestin, en même temps d'ailleurs que certaines VLDL . La proportion relative de ces deux variétés dépend de la nature des acides gras absorbés: si les acides gras éthéniques prédominent, la répartition est en

faveur des chylomicrons .Ces derniers se forment dans les cellules de l'intestin grêle, mais plus intensément au niveau du jéjunum .

Les essais effectués sur la formation des chylomicrons ont permis les conclusions suivantes :

1- C'est dans les ribosomes des entérocytes que se forment les apoprotéines A et B . Les chylomicrons contiennent pourtant également des apoprotéines C ; celles-ci proviennent du foie et s'incorporent dans les chylomicrons par "échanges" avec d'autres lipoprotéines (222) .

2- Les triglycérides, formés à partir des acides gras et des monoglycérides provenant de la digestion des graisses , sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique ; ils captent les apoprotéines (51,91) et s'unissent ensuite au cholestérol libre, au cholestérol estérifié et aux phospholipides pour former les chylomicrons .

b) VLDL

Ces lipoprotéines ont une double origine : hépatique et intestinale .

1- Synthèse hépatique

Pour bien comprendre les divers stades de la biosynthèse des VLDL hépatiques appelées encore lipomicrons, il nous semble opportun de rappeler brièvement la structure histologique de la cellule hépatique (hépatocyte) .

Les hépatocytes sont des cellules polyédriques à 6 ou 8 faces, possédant au moins deux pôles vasculaires et plusieurs pôles biliaires . Aux pôles vasculaires se trouvent des villosités faisant saillie dans l'espace de Disse, qui séparent les sinusoïdes des hépatocytes ; aux pôles biliaires, la membrane s'est séparée de celle de la cellule voisine pour former un canalicule biliaire . Le noyau volumineux comporte un ou deux nucléoles .

Le cytoplasme renferme :

a - des mitochondries (cyclophorase)
b - des réticulums endoplasmiques granulaires
c - des réticulums endoplasmiques lisses
d - des ribosomes, qui parfois peuvent se réunir et former des polysomes
e - des appareils de Golgi
f - des lysosomes proches des canalicules biliaires
g - des peroxysomes renfermant des peroxydases
h - des inclusions diverses (glycogène , lipides, pigments ...)

Enfin, les cellules réticulaires bordantes des sinusoïdes peuvent exercer une action macrophagique et se développer considérablement (cellules de Kupffer) .

La figure 28, inspirée de divers ouvrages , rend compte de la structure de l'hépatocyte (*) .

Le point de départ pourrait être constitué par la synthèse de peptides, en particulier ceux rencontrés dans les LDL et les HDL, dans les ribosomes des hépatocytes . Cette supposition est fondée sur le fait qu'il a été possible d'obtenir la synthèse in vitro des protéines des LDL et HDL avec un homogénat de foie de Rat (Marsh et coll. (181)) . Les peptides ainsi formés fixeraient des lipides avant même leur détachement du ribosome (84) . Cela n'est encore qu'une hypothèse fondée, entre autres choses, sur la synthèse possible par le système-ribosome-enzyme d'associations apoprotéines-acides gras (181) . Quoi qu'il en soit, les peptides ayant déjà fixé des lipides se lieraient alors avec un reste osidique ; plusieurs séries de recherches ont mis, en effet, en évidence l'affinité de ces peptides pour divers dérivés glucidiques (Lo et Marsh (161), Lawford et coll.(153)).

(*) voir en particulier (207).

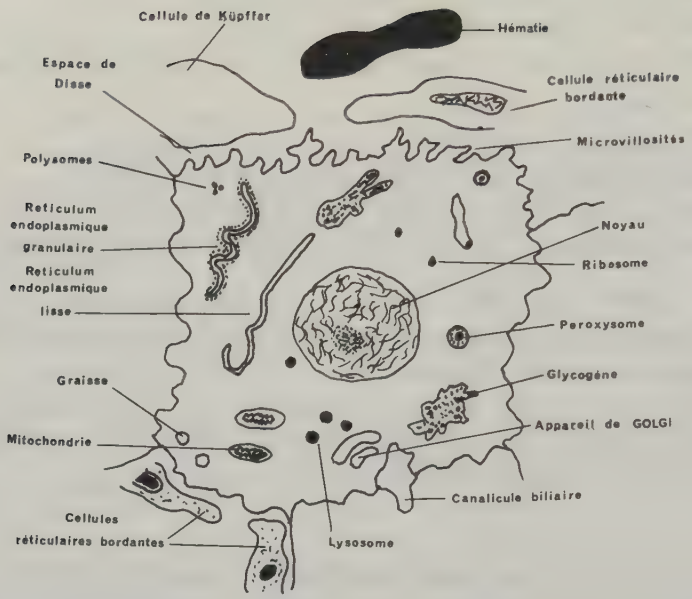


Fig. 28 - hépatocyte

Par ailleurs, on est parvenu à localiser les régions de fixation de divers glucides (N-acétylglucosamine au niveau des polysomes, mannose dans le réticulum lisse, galactose au niveau de l'appareil de Golgi) ; la glucosamine et l'acide sialique seraient fixés en dernier (voir 211) (*) .

Ce complexe peptide-oside constituerait une étape obligatoire dans la formation des protéines plasmatiques (Eylar (77)) . Les complexes ainsi formés à l'extérieur des vésicules endoplasmiques traverseraient alors la membrane de ces dernières, afin de pénétrer à l'intérieur de la vésicule . Les phospholipides membranaires se renouvelant plus rapidement au cours de cette traversée , on

(*) Pour certains auteurs (161, 33, 318), la fixation de tous les glucides aurait pour siège l'appareil de Golgi.

a supposé que les complexes pouvaient fixer des molécules de phospholipides lors de ce passage . La fixation des lipides continuerait à l'intérieur de la vésicule, c'est-à-dire là même où se synthétisent ces lipides . Ces nouveaux complexes se "stockeraient" alors dans le Golgi, avant d'être sécrétés dans le milieu extérieur par pinocytose (*) .

Le mécanisme suivant lequel les divers lipides se fixeraient sur les peptides reste totalement inconnu . On peut imaginer, avec Infante (128) , que dans un premier temps le cholestérol et les triglycérides s'associent en un noyau et que ce dernier se recouvre d'une couche d' esters de cholestérol, de phospholipides et d'apoprotéine, ces trois dernières substances formant un véritable "filet" autour de l'ensemble . Ainsi donc se formeraient les VLDL, que le microscope électronique permet de voir dans les vésicules du réticulum lisse (140, 111, 268) , avant de les suivre dans l'espace de Disse, où aurait lieu leur libération .

Les VLDL que l'on a pu isoler des vésicules de Golgi ont été comparées à celles que l'on trouve dans le plasma . Des études électrophorétiques ont mis en évidence une composition en peptides relativement voisine ; cela laisse penser que par la suite les VLDL fraîchement élaborées peuvent incorporer d'autres peptides afin de compléter leur structure .

La biosynthèse hépatique des VLDL se trouve réglée par divers facteurs :

- apport de lipides et particulièrement d'acides gras, surtout éthéniques (321), sous forme de complexes avec la sérum albumine (224, 111) ; on sait, en effet, que c'est sous cette forme que se trouvent les acides gras libérés des chylomicrons et des VLDL par la lipoprotéine lipase (221) ; ces acides gras favorisent en outre la biosynthèse des apoprotéines des VLDL par l'intermédiaire des ARN messagers (7) .
- mobilisation d'acides gras provenant des réserves .
- mobilisation d'acides gras d'origine glucidique (68,325) .

(*) Ce transfert peut être inhibé par la colchicine (271).

2 - Synthèse intestinale

Comme nous l'avons rappelé précédemment, ce n'est qu'en 1966 que l'on s'est aperçu que les VLDL ne se formaient pas exclusivement dans le foie . Plusieurs types d'expériences ont mis en évidence la formation des VLDL en dehors du foie et dans l'intestin en particulier : chez le chien hépatectomisé, il se forme encore des VLDL (223) ; le blocage de la sécrétion des VLDL par le foie à l'aide d'acide orotique n'empêche pas les VLDL de se former dans l'organisme (324) ; les cellules intestinales isolées au cours de l'absorption des graisses renferment des VLDL (115, 131) ; le prélèvement du contenu des lymphatiques intestinaux par canulation permet la mise en évidence des VLDL . Comme dans le cas des chylomicrons, les apoprotéines A et B sont synthétisées in situ , mais l'apoprotéine C provient du transfert à partir d'autres fractions .

Il existe beaucoup de points communs entre les mécanismes de formation hépatique et intestinale . Les VLDL intestinaux présentent simplement une gamme de masse moléculaire plus étendue que celle provenant du foie .

c) LDL

L'apparition des LDL suit en général l'excrétion hépatique des VLDL, ce qui a laissé suggérer la transformation possible des VLDL en LDL ; les chylomicrons peuvent également se transformer en LDL (70) , après formation d'un composé intermédiaire (79), mais il n'est pas exclu que le foie puisse secréter directement des LDL (voir 134) .

Un certain nombre de faits ont pu être mis en évidence à propos de la formation des LDL .

1- au cours du catabolisme des VLDL, l'apoprotéine B est transférée dans les LDL .

2- la conversion VLDL → LDL est liée à l'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase et au départ du cholestérol et des phospholipides .

3- chez les malades présentant un taux très bas de VLDL (hypo- β - lipoprotéinémiques), il apparaît également une diminution des LDL (151) .

4- l'acide nicotinique qui diminue la production hépatique des VLDL amène également une baisse du taux des LDL plasmatiques .

5- l'apoprotéine B et le cholestérol des VLDL se retrouvent dans les LDL (vérifié à l'aide d'éléments marqués) (30,68,69,71, 72,73,75) .

Tous ces faits confirment l'origine des LDL;elles proviennent bien des VLDL (69, 120) .

d) HDL

Nos connaissances sur la biosynthèse des HDL restent très limitées . Cela est dû pour une grande part à leur faible concentration dans les hépatocytes, ce qui ne permet pas une visualisation avec les techniques habituelles .

Les HDL, qui, on le sait, constituent les transporteurs privilégiés du cholestérol des tissus au foie, sont synthétisées dans le foie et l'intestin : la perfusion d'un foie en période de régénération (après hépatectomie partielle chez le Rat) provoque une augmentation très notable des HDL plasmatiques (256); les HDL ont été également mises en évidence dans l'intestin.

Les HDL hépatiques contiennent à la fois des apoprotéines A et C, tandis que celles qui proviennent de l'intestin ne renferment que l'apoprotéine A .

Signalons qu'il existe une affection due à une déficience (héréditaire) en HDL . Cette affection, la maladie de Tangier, décrite par Fredrickson (89), se manifeste par un certain nombre de signes : diminution des HDL plasmatiques, dépôts de cholestérol estérifié dans les cellules du système réticulo-endothélial, synthèse des apoprotéines perturbée chez ces malades (11, 165) .

B - CATABOLISME DES LIPOPROTEINES SERIQUES

Ce catabolisme fait appel à des réactions enzymatiques et il n'est pas superflu, pour en comprendre le mécanisme, de passer tout d'abord en revue les enzymes qui interviennent . Nous envisagerons ensuite le catabolisme des diverses fractions lipido - protéidiques, que nous complèterons par une étude schématique des échanges entre constituants lipidiques et protidiques .

1°- Les enzymes du catabolisme des lipoprotéines .

Nous résumerons simplement les principales propriétés de ces divers enzymes, renvoyant le lecteur aux nombreuses revues générales publiées sur ce sujet . Nous insisterons cependant sur les propriétés qui apportent des explications aux expériences que nous présenterons plus loin .

Les principaux enzymes du catabolisme lipoprotéidique sont : la lipoprotéine lipase (ou facteur clarifiant), la lécithine - cholestérol -acyl-transférase (ou LCAT) , les glycéride-lipases et les phospholipases .

a) La lipoprotéine lipase (ou facteur clarifiant) (*)

Il y a longtemps que la clarification post-digestive du plasma sanguin préoccupe les physiologistes . C'est à Hahn (108) que revient le mérite d'avoir effectué, dès 1943, les premières expériences fondamentales : cet auteur avait constaté que la transfusion d'un sang de chien, rendu incoagulable à l'aide d'héparine ,

(*) Voir à ce sujet une revue de Tayeau, Jensen et Aubertin (293), où, à côté d'une abondante bibliographie, où nous renvoyons le lecteur, on trouvera indiquées les principales revues générales parues sur ce sujet. Pour la rédaction de ce paragraphe, nous avons effectué des emprunts à des revues de Tayeau (289, 288).

à un autre chien en période post-digestive amenait la clarification du plasma de l'animal transfusé . Les anticoagulants autres que l'héparine ne permettaient pas la reproduction du phénomène. Par ailleurs, il suffit d'injecter de l'héparine à un animal en période post-digestive pour provoquer la clarification de son plasma sanguin . Enfin, l'héparine, ajoutée in vitro à un plasma lactescent, se montre absolument inactive . Il fallait donc conclure que l'injection d'héparine suscitait la libération dans la circulation d'un facteur capable de clarifier le plasma, rendu lactescent par l'arrivée des graisses provenant de la digestion ou encore éventuellement des réserves .

1- Nature

Grâce aux techniques modernes, et à la chromatographie en particulier, on a pu isoler l'enzyme . Si la purification est très poussée (passages successifs sur des colonnes de phosphate tricalcique), le produit devient inactif . Cette perte d'activité se trouve liée au "départ" de l'héparine, retenue par l'adsorbant .

L'héparine est non seulement capable de susciter l'apparition du facteur clarifiant, mais encore se montre nécessaire à son action . Certaines substances présentant une parenté avec l'héparine peuvent se substituer à cette dernière (chondroïtine - sulfate, polysaccharides bactériens, acide hyaluronique, acides alginiques, sulfate de dextrane, extraits de muqueuses gastrique ou duodénale renfermant des mucopolysaccharides ...) ; d'autres substances fort différentes (comme par exemple la désoxy-corticostérone et des dérivés voisins) sont également actifs ; on a pu isoler des produits de dégradation de l'héparine présentant une très grande activité (Cantone) .

La lipoprotéine lipase se trouve surtout dans le myocarde, le tissu adipeux, les muscles squelettiques, le poumon, le foie, l'aorte, etc ... Le cerveau n'en renferme pas .

Le substrat

La lactescence du plasma est provoquée par l'apparition dans la circulation des chylomicrons . Ce sont les triglycérides de ces derniers, ainsi que ceux des VLDL, qui constituent le substrat

de la lipoprotéine lipase . Ces fractions sont d'abord transformées en LDL .

Clarification

Celle-ci peut être étudiée au photomètre par la mesure de la diminution de l'opacité en fonction du temps, après addition de lipoprotéine lipase à un sérum lactescent . Après action de la lipoprotéine lipase, le taux des glycérides diminue et celui des acides gras et du glycérol augmente . Le facteur est donc bien une lipase (135) .

L'enzyme n'exerce aucune action sur une émulsion d'huile (Korn) ; il n'en est plus de même en présence du sérum .Cela est dû au fait qu'un "récepteur" est nécessaire pour la fixation et la solubilisation des acides gras libérés . Le récepteur naturel est la sérumalbumine (Robinson (220)) . Cette propriété particulière de la sérum albumine est liée pour une grande part à sa grande surface d'adsorption (Tayeau et Dumon (292)) .

2 - Activateurs - inhibiteurs

Comme tout enzyme, le facteur clarifiant est activé par certaines substances (nicotamide,pyridoxal, glucides divers), inhibé par d'autres (sels biliaires, sulfate de protamine) . Mais il existe in vivo un activateur nécessaire à l'activité de la lipoprotéine lipase , c'est l'apoprotéine CII . Au contraire, les apoprotéines C I et CIII agissent en sens inverse .

L'existence d'un inhibiteur naturel a pu être mise en évidence (Hollett et Meng) ; Tayeau , Jouzier et Tixier ont étudié en détail cet inhibiteur (294, 295, 296) qui apparaît d'ailleurs dans le sang et l'urine chaque fois que l'organisme est soumis à une agression . Cet inhibiteur , qui appartient à la classe des mucoprotéines, présente une composition connue (Tayeau, Biserte, Montreuil, Dautrevaux et Marquevielle (291,32)).

3- Etudes physiologiques

On a pu démontrer qu'au cours de la période post-digestive, le facteur clarifiant devait être libéré dans la circulation sous l'influence de l'héparine ; on a pu constater, en effet, que pendant

cette période, les cellules basophiles perdaient leurs granulations (Shelley et Juhlin) ; or, ces cellules interviennent justement dans l'excrétion de l'héparine.

Grâce à la mise en œuvre d'acides gras marqués, on a établi la destinée des acides gras en provenance des chylomicrons, qui est triple : foie, tissu adipeux, cellules les utilisant comme source d'énergie. Si les chylomicrons plasmatiques sont peut-être capables de traverser certains capillaires sinusoïdes du foie, grâce aux "fenêtres" de ces derniers, ils ne peuvent certainement pas traverser la membrane de l'endothélium vasculaire. On a démontré en revanche que les acides gras se montraient capables d'effectuer cette traversée et qu'ainsi l'action du facteur clarifiant se manifestait dans la circulation. Les acides gras libérés se fixent, nous l'avons vu plus haut, sur la sérumalbumine (Robinson (220)) et le complexe albumine-acides gras formé, dont la vie est très courte, se décompose et les acides gras sont alors utilisables. Notons que, bien avant les travaux de Robinson, Tayeau et coll. (302) avaient déjà entrevu ce phénomène : ils avaient noté, en effet, qu'après incubation, les lipides, qui à l'électrophorèse avaient migré au niveau de la sérumalbumine, cédaient facilement in vitro leurs acides gras à du tissus périrénal préalablement dégraissé. Bien plus, le facteur clarifiant agit au niveau de l'endothélium vasculaire. La microscopie électronique a permis de constater que les chylomicrons se fixaient le long des cellules endothéliales des petits vaisseaux (French) : c'est à cet endroit que, selon Robinson, se ferait l'association entre les chylomicrons et la lipoprotéine lipase par l'intermédiaire de l'héparine endothéliale. Les acides gras seraient alors libérés et pénètreraient dans la cellule.

La lipoprotéine lipase constituerait le régulateur de l'entrée des acides gras dans les cellules. On ne peut s'empêcher de rapprocher de cette hypothèse le rôle de l'insuline dans la pénétration du glucose dans les cellules (Robinson).

4 - Aspects pathologiques

De nombreuses affections, caractérisées par des troubles du métabolisme des graisses, intéressent la lipoprotéine lipase, principalement l'hypertriglycéridémie de type I (hyperchylomicronémie).

b) La lécithine : cholestérol-acyl-transférase (*)

Cet enzyme (LCAT), découvert par Glomset (95) en 1962 , avait déjà été entrevu et étudié, il y a plus de quarante ans, par Sperry (265) . Cet auteur a constaté que si l'on place du sérum sanguin à l'étuve à 37°C, c'est-à-dire dans des conditions comparables à celles qui existent in vivo , le cholestérol estérifié augmente aux dépens du cholestérol libre . Il se synthétise donc des esters du cholestérol . L'auteur a pensé que cette réaction était due à un enzyme auquel il a donné le nom de cholestérolestérase .

L'origine des acides gras, nécessaires à cette estérification, soupçonnée par Sperry, a été prouvée par Le Breton et Pantaléon : ces auteurs ont démontré, en effet, que les acides gras provenaient de la décomposition des lécithines qui se transformaient en glycérophosphorylcholine, sous l'influence d'une léci - thase B (**) .

Plusieurs inhibiteurs de la réaction ont été alors décrits : le monobromacétate de sodium, le phloridzoside et surtout les sels biliaires (***) ; si l'on effectue l'incubation en présence de sels biliaires, l'estérification du cholestérol ne se produit pas : cette constatation, observée par Sperry et Stoyanoff, a été étudiée par Bénard, Polonovski et coll. par Chabrol et coll., par Favarger et coll. , par Tayeau et Nivet, et explique le fait que les malades cholalémiques ne présentent pratiquement dans le sang que du

(*) On consultera avec infiniment d'intérêt le compte-rendu du symposium : Plasma lipoproteins in familial lecithine-cholesterol-acyltransferase deficiency, publié à Scand. J. clin. lab. Inv., 1975, 35, (supplt 142), 1-55.
Voir également (305). Pour la rédaction de ce paragraphe, nous avons effectué des emprunts à une revue de Tayeau (290).

(**) On a démontré par la suite que l'addition de lécithines au sérum, dans certaines conditions, augmente la quantité d'esters du cholestérol formés (316).

(***) et, dans certaines conditions, le cholestérol lui-même (315).

cholestérol libre ; elle explique également l'hypercholestérolémie de ces malades, et en particulier de ceux atteints d'ictère oblitérant ; il apparaît , en effet, que le cholestérol non estérifié n e rentre pas ou rentre mal dans sa voie métabolique et a ainsi tendance à s'accumuler dans la circulation . En résumé, on admettait donc, avant les travaux de Glomset, qu'au cours de l'incubation du sérum, une lécithase B sérique décomposait les lécithines et libérait des acides gras, qui se fixaient sur le cholestérol libre, grâce à une cholestérolestérase .

Ces observations ont fait l'objet de quelques retouches: Swell et Treadwell, puis Tayeau et Nivet ont mis en doute, à la lumière d'arguments variés et différents, l'existence de la cholestérolestérase sérique : selon ces auteurs, l'estérification du cholestérol constituerait un phénomène physico-chimique ; un enzyme unique, la lécithase, intervenait donc dans la réaction . Par ailleurs, Etienne et Polonovski démontraient que la décomposition des lécithines donnait intermédiairement naissance à des lysocithines .

1- Mode d'action

C'est alors qu'en 1962, Glomset a démontré qu'il n'y avait en fait qu'un seul enzyme, qui transférait l'acide gras des lécithines en position β (transformant ainsi ces dernières en lysocithines) sur le cholestérol libre, devenant ainsi du cholestérol estérifié . A cet enzyme unique, il donnait le nom de lécithine-cholestérol-acyl-transférase (ou LCAT) . Glomset a réalisé de très nombreux travaux et démontré, entre autres choses, que l'enzyme se trouvait dans les α-lipoprotéines et que l'hydroxy-mercuri-benzoate de sodium constituait un puissant inhibiteur de la réaction . On peut obtenir facilement à présent l'enzyme à l'état purifié (6) .

Tayeau et Nivet (298) avaient préalablement démontré que l'estérification du cholestérol sérique était liée à d'importantes modifications du diagramme électrophorétique des lipoprotéines: lorsque l'on compare , en effet, le lipoprotéinogramme sur papier avant et après incubation, on note des différences entre les diagrammes ; la fraction α-lipoprotéine a migré un peu plus en avant, mais surtout la β-lipoprotéine se présente à la place de l' α_2 - lipoprotéine ; en revanche, le protéinogramme ne montre pas de différence sensible . Les deux phénomènes (transfert de l'acide gras

de la lécithine sur le cholestérol et modification du diagramme électrophorétique) sont bien liés l'un à l'autre, car les inhibiteurs de l'un constituent les inhibiteurs de l'autre . Cette modification des lipoprotéines, signalée dès 1955 par Tayeau et Nivet, était par la suite confirmée et expliquée (voir 305) .

2- Substrat

Il est admis aujourd'hui que le substrat de la LCAT est constitué par les lécithines et le cholestérol libre de la fraction HDL . Mais, parallèlement à l'hydrolyse des lécithines et à l'estérification du cholestérol, il se produit des échanges entre la fraction HDL et les fractions LDL et VLDL : tandis que des lécithines et du cholestérol libre migrent des VLDL et des LDL vers les HDL, le cholestérol estérifié suit un chemin inverse (Akanuma et Glomset) .Cette action sur les HDL ne serait probablement pas exclusive : on admet en effet, que les VLDL et les LDL viennent s'associer aux HDL ou à certaines apolipoprotéines de ces dernières pour permettre à la LCAT d'agir également sur les lipoprotéines légères .Ces diverses modifications au sein des lipoprotéines expliquent les changements des diagrammes électrophorétiques avant et après incubation du sérum .

3- Activateurs-inhibiteurs

L'apoprotéine C I constitue un bon activateur de la LCAT (Fielding, Shore et Fielding) ; l'apoprotéine CII diminue l'activité de C I . La présence dans le milieu de chylomicrons ou de VLDL augmente la vitesse de réaction de la LCAT .

4- Etude physiologique et pathologique

Il est généralement admis que le cholestérol ne peut entrer dans ses voies métaboliques que s'il se trouve à l'état d'esters .Il a été démontré à ce sujet que le sérum incubé cède bien plus facilement son cholestérol à du tissu périrénal dégraissé que le même sérum non incubé (Tayeau et Nivet) ; on comprend ainsi le rôle de la LCAT dans le métabolisme des substances lipidiques et du cholestérol en particulier . La LCAT vient pour une certaine part compléter le rôle dévolu au facteur clarifiant (Glomset et coll.) .

L'intérêt pathologique est lié au fait qu'il existe des individus chez lesquels cet enzyme est absent . Cela crée un syndrome, d'origine héréditaire, décrit par Norum et coll. (195) .Ce syndrome se manifeste, entre autres choses , par de l'anémie, de l'albuminurie et la présence de taches sur la cornée . Quelques cas ont été décrits jusqu'alors et leur nombre augmente régulièrement .

c) Triglycéride lipase (*)

Cet enzyme possède la propriété de catalyser l'hydrolyse des triglycérides en diglycérides et acides gras .Chez l'homme, il présente une affinité plus grande pour l'acide gras en position 1, que pour ceux en position 2 et 3 . Comme c'est le cas pour la lipoprotéine lipase, l'injection d'héparine augmente nettement l'activité de la triglycéride lipase, mais, dans ces conditions, on observe aussi une hydrolyse des diglycérides et même des monoglycérides ; on se demande alors si cette dernière propriété est due à une activité plus étendue de l'enzyme ou bien à la présence de di et de monoglycéride-hydrolases différentes .

La triglycéride lipase est d'origine hépatique (Pyralisto et coll.) : l'injection d'héparine chez l'animal hépatectomisé est sans effet sur la libération de la triglycéride lipase (Greten et coll.) . Cet enzyme, qui, comme la lipoprotéine lipase, attaque les triglycérides s'en différencie cependant : contrairement à cette dernière, il n'est pas activé par l'apoprotéine CII et, de plus, il n'est pas inhibé par le sulfate de protamine . La triglycéride lipase a été obtenue à l'état relativement pur (Greten et coll.) et l'on a pu mettre en évidence un syndrome héréditaire résultant de son absence (Fredrikson et Levy) . Ce syndrome se manifeste par des coliques abdominales, une hépato-splénomégalie et l'apparition de xanthome ; le plasma de ces malades présente une importante hypertriglycéridémie .

(*) voir la revue de Jackson, Morrissett et Gotto (134).

d) Les Phospholipases

L'injection d'héparine, nous l'avons vu plus haut, provoque l'apparition dans le sang de lipoprotéine lipase et de triglycéride lipase; elle provoque également la libération de phospholipases (Waite) .

On a pu mettre en évidence une phospholipase A 1 et une phospholipase A 2 ; ces enzymes s'attaquent aux lécithines qu'elles transforment respectivement en 1 et en 2 -acylglycéryl-phosphocholine . Ces derniers dérivés, qui sont fixés à la sérum albumine, ont une vie extrêmement courte .

Les phospholipases se trouvent dans les membranes cellulaires . On a discuté sur le rôle éventuel de la phospholipase A2 : cette dernière peut être libérée chez le Rat par injection d'un facteur extrait des plaquettes (Polonovski et coll.) .

2°- Catabolisme des diverses lipoprotéines.

a) Chylomicrons

Les chylomicrons disparaissent de la circulation en moins d'une heure (190) . On admet qu'ils puissent suivre deux processus cataboliques (257) : ils peuvent être soit captés directement par les tissus, principalement par le tissu adipeux, soit attaqués dans la circulation par des enzymes ; les produits de transformation (remnants) sont alors détruits dans le foie .

Lors du premier processus, les triglycérides des chylomicrons sont captés par les tissus cardiaque et musculaire, mais surtout par les adipocytes (*) et hydrolysés en leurs constituants, grâce à la lipoprotéine lipase (activée par l'apoprotéine C II (220, 102, 253)), dont ces tissus se montrent particulièrement riches; les acides

(*) Le tissu adipeux est capable de capter d'importantes quantités de triglycérides (27).

gras libérés passent dans la circulation avant d'être utilisés (*) . On ne connaît pas très bien le mécanisme suivant lequel les triglycérides des chylomicrons sont attaqués par la lipoprotéine lipase, mais on suppose que certains constituants superficiels de la particule , comme les acides gras insaturés, les lysocithines et les monoglycérides, favoriseraient leur fixation, véritable "fusion" sur la membrane, et permettraient alors l'action de l'enzyme et éventuellement celle de la LCAT (voir 134) . Cette hydrolyse serait effectuée très rapidement (247) . Finalement, il ne reste plus que les apoprotéines, qui sont alors transférées ailleurs : c'est ainsi que l'apoprotéine C passe sur les HDL .

Dans le second processus, les chylomicrons sont attaqués par la lipoprotéine lipase dès leur arrivée dans la veine sous-clavière gauche . Cette attaque des triglycérides se trouve favorisée par le fait que l'apoprotéine C II (activateur de la lipoprotéine lipase) est transférée des HDL sur les chylomicrons (120) . On s'explique ainsi que les chylomicrons prélevés dans le canal thoracique sont moins rapidement attaqués par la lipoprotéine lipase que ceux de la circulation (65) . Ils se résolvent ainsi en particules plus petites, encore riches en phospholipides et en esters de cholestérol ; certaines de ces particules se transforment en LDL (69, 120) (voir p.95) . La plupart sont détruites dans le foie (190); il a été , en effet, démontré que si l'on injecte des chylomicrons dont certains constituants ont été marqués par des isotopes radioactifs , à des rats hépatectomisés, on retrouve dans la circulation les particules précitées renfermant les éléments radioactifs (217) . Il a été également prouvé , toujours grâce aux éléments marqués, que 80 p.100 des esters de cholestérol des chylomicrons injectés se retrouvent dix minutes plus tard dans le foie (217) .Ces esters du cholestérol sont alors hydrolysés in situ (272) et le cholestérol est, en partie libéré (193) , en partie transformé en acides biliaires .

(*) Selon divers auteurs (257), certains triglycérides, et particulièrement ceux des chylomicrons, seraient attaqués par une triglycéride lipase dans l'endothélium des capillaires extra-hépatiques, et dans le tissu adipeux en particulier. Les diglycérides formés seraient alors captés par les tissus (voir 134).

b) VLDL

Le catabolisme des VLDL dont la demi-vie est de 6 à 12 heures, présente certains points communs avec celui des chylomicrons . Les VLDL, quelle que soit leur origine, sont attaquées, au même titre que les chylomicrons, par la lipoprotéine lipase , qui hydrolyse des triglycérides (220,102,253) ; cette hydrolyse est favorisée par la présence, dans la fraction , d'apoprotéine C II , activateur de l'enzyme . Il faut signaler également que les triglycérides des VLDL peuvent être attaqués, en particulier dans le foie, par la triglycéride lipase (*) , l'enzyme qui, nous l'avons vu plus haut, attaque les remnants des chylomicrons (144) . Dans ces conditions, les VLDL se transforment en particules de plus en plus petites et de plus en plus denses (217, 120) ; au fur et à mesure qu'elles s'appauvrissent en triglycérides, la vitesse d'hydrolyse diminue . Finalement, on aboutit à la formation de LDL, qui, on a pu le vérifier, renferment bien l'apoprotéine B et le cholestérol en provenance des VLDL ou éventuellement des chylomicrons (69,120) . Cette transformation des VLDL en LDL a pu être prouvée dans diverses espèces animales, grâce aux éléments marqués (80,30,68,71,75,244). Cette transformation des VLDL en LDL ne comporte pas seulement l'hydrolyse des triglycérides ; elle implique également le départ des apoprotéines C et D, qui sont en général transférées sur HDL, un enrichissement en cholestérol estérifié , qui provient des HDL (3) (signalons à ce sujet que le rapport cholestérol estérifié/apoprotéine B , qui est de 0,8 dans les VLDL, est de 1,2 dans les HDL) et un départ des phospholipides et du cholestérol libre .

Les HDL jouent un grand rôle dans le catabolisme des VLDL, d'abord comme accepteurs de l'apoprotéine C et du cholestérol libre, ensuite comme activateur et substrat de la LCAT . Il a été démontré que la thyroïde intervient également dans ce catabolisme : dans le sang des hypothyroïdiens, on rencontre surtout des fractions intermédiaires entre les VLDL et les LDL, comme si le catabolisme n'avait pu être mené à son terme .

(*) Selon certains, la triglycéride lipase du tissu adipeux attaquerait préférentiellement les triglycérides des chylomicrons, tandis que celle du foie hydrolyserait plutôt ceux des VLDL (voir 134).

Signalons encore , à propos du passage des VLDL aux LDL,que dans l'hyperlipémie de type III de Fredrickson,on observe à l'électrophorèse une certaine fraction appelée β-flottante.Cette fraction forme une large bande recouvrant les β-et les pré β-lipoprotéines . Si, d'un tel sérum, on isole la fraction et qu'on l'étudie à l'ultracentrifugation, on lui trouve une densité inférieure à 1,006, qui est celle d'une VLDL et non celle d'une LDL, comme on aurait pu s'y attendre . Les VLDL de ces sujets présentent un rapport cholestérol/triglycérides bien plus élevé que normalement (90) . Signalons encore que ces malades présentent des dépôts lipidiques sur diverses régions (main, coude , genou : ....) et une propension marquée vers l'athérosclérose . Une étude plus poussée a montré que les VLDL de ces sujets renfermaient une quantité notable d'apoprotéine riche en arginine (254,120) . Il doit exister chez ces malades un "blocage" de la dégradation des remnants des VLDL , à moins qu'il s'agisse de produits résultant d'une voie métabolique différente (voir 134) .

c) LDL

Le catabolisme est encore mal connu . On sait simplement que la demi-vie de cette fraction est de l'ordre de 3 jours (150) .

Pour essayer de clarifier le problème de la destinée des LDL dans l'organisme, on a fait appel aux troubles du catabolisme de cette fraction : on a noté que dans l'hyperlipémie de type II, ce catabolisme est nettement ralenti (150, 218) . Diverses causes ont été invoquées pour expliquer ce phénomène : intensification de la biosynthèse de l'apoprotéine B (218,258) , structure anormale des LDL (1) , absence de récepteur nécessaire à la dégradation par les tissus périphériques (98) . L'influence des acides gras polyinsaturés du régime, qui interviennent sur la composition des lipides des LDL, n'a pas non plus éclairci le problème (307) .

On n'est pas très bien fixé sur le lieu de la dégradation des LDL : des expériences de perfusion réalisées avec le foie de Rat et mettant en œuvre des éléments marqués laisseraient admettre que cette glande constitue le lieu de dégradation des LDL (121) ; on a cependant signalé chez le porc hépatectomisé, une augmentation du catabolisme des LDL (260) !

d) HDL

Nos connaissances sur le catabolisme des HDL sont encore rudimentaires . Cette fraction , dont la demi-vie est voisine de 10 heures (226), peut être catabolisée dans le foie (226) ; des études récentes ont cependant mis en évidence la possibilité pour les fibres musculaires lisses d'aorte de Rat en culture de réaliser ce catabolisme (29) .

D'intéressantes études ont été enfin réalisées par Roheim (225) et Eisenberg (75) avec des HDL, dont les apoprotéines étaient marquées à l'iode 125 . Des résultats de ces auteurs, on peut conclure que la radioactivité de l'apoprotéine A diminue plus rapidement que celle de l'apoprotéine C, ce qui laisse suggérer (selon 134) que cette dernière est libérée et réutilisée au sein de la circulation .

3°- Les interconversions au sein du catabolisme des lipoprotéines .

Comme nous l'avons expliqué au début de ce chapitre, c'est pour des raisons didactiques que nous avons séparé les diverses lipoprotéines pour étudier leur catabolisme . Nous avons également signalé en cours de route le caractère dynamique de ces composés, qui se trouvent en perpétuelles transformations et échangent continuellement des constituants les uns avec les autres . Nous ne pensons pas inopportun de résumer en un schéma (fig. 29) le métabolisme des diverses lipoprotéines, afin de mieux mettre en évidence les interconversions qui les concernent . Nous n'avons pu mentionner dans ce tableau schématique que les principales voies . Nous n'avons pas signalé non plus les nombreux échanges qui s'effectuent continuellement entre les lipoprotéines plasmatiques et les érythrocytes, les membranes et même certains constituants cellulaires, ces problèmes dépassant le cadre que nous nous sommes fixée . Bien des inconnues persistent encore, les travaux évoluent cependant très vite et il est probable que, pendant la publication de ce travail, plusieurs lacunes auront été comblées .

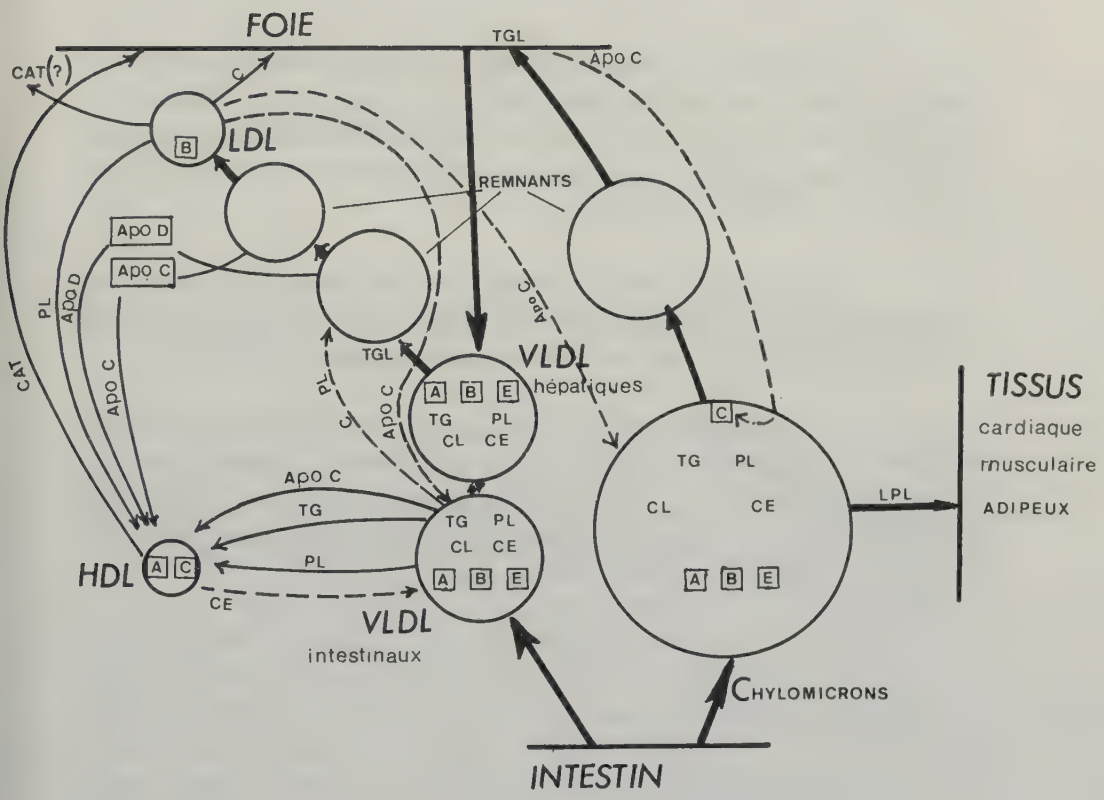


Fig. 29

VLDL : very low density lipoproteins
LDL : low density lipoproteins
HDL : high density lipoproteins
CAT : catabolisme

TG : triglycérides
PL : phospholipides
CL : cholestérol libre
CE : cholestérol estérifié
LPL : lipoprotéine lipase
TGL : triglycéride lipase
C : cholestérol
A, B, C, D, E : apoprotéines

Certains problèmes relatifs à la biosynthèse et au catabolisme des lipoprotéines semblent avoir été un peu délaissés , en particulier le mécanisme de fixation des divers lipides sur les apoprotéines in vivo ; seules quelques expériences in vitro ont tenté d'expliquer ce mécanisme .

Le rappel des travaux effectués dans ce domaine et les expériences que nous avons réalisées sur ce sujet font l'objet de la première partie de nos recherches personnelles .

Le problème des échanges entre les lipides des diverses fractions lipidoprotéidiques a été, en revanche, souvent envisagé. Il reste encore cependant un certain nombre de points vulnérables qu'à la faveur de nos expériences, nous exposerons dans la seconde partie de nos recherches personnelles .

II - RECHERCHES PERSONNELLES

A - INTEGRATION D'OLEATE DE SODIUM AU SEIN DES LIPOPROTEINES

Plusieurs auteurs ont cherché à "intégrer" divers lipides au sein d'associations lipidoprotéidiques du sérum ; leur but était d'abord de mesurer la possibilité du sérum de capter des lipides in vitro, ensuite d'essayer de localiser la fixation des lipides.

Nous n'évoquerons pas d'anciennes recherches (voir p. 15), auxquelles nous avons fait allusion plus haut, mais nous rappellerons les intéressants travaux réalisés, dès 1928, par Loeper , Lemaire et Lesur (162) et relatifs au pouvoir cholestérolytique du sérum . Ce pouvoir est en rapport avec la propriété que possède le sérum, additionné de cholestérol et laissé à la température de 38° C, de dissoudre du cholestérol (pouvoir cholestérolytique positif) ou, au contraire, de laisser précipiter une partie de son propre cholestérol (pouvoir cholestérolytique négatif) . Par la suite , d'autres auteurs (Theorell (306) , Alvarez et Neuschlosz (8) , Obrecht (196)) ont décrit des tests voisins .

Voulant trouver une explication au pouvoir cholestérolytique positif, Loeper et coll. ont étudié la répartition du cholestérol entre la fraction globuline et la fraction albumine (*) avant

(*) Il s'agit, bien entendu, des "globulines" et des "albumines" séparées par relargage et qui représentent en réalité des mélanges très hétérogènes (voir p. 13).

et après incubation . Ils ont noté que si l'incubation provoque un "passage" du cholestérol des "albumines" vers les "globulines", le pouvoir cholestérolytique était généralement positif . Ils avaient en réalité, dès 1928, mis en évidence , et sans le savoir, l'action de la LCAT et le passage du cholestérol d'une fraction sur une autre . Ils étaient, de toute façon, parvenus à montrer la fixation du cholestérol sur les lipoprotéines sériques et à former ainsi de nouvelles associations . Cependant ce cholestérol ajouté échappait , contrairement au cholestérol déjà contenu dans le sérum, à diverses réactions "physiologiques" (316) , comme l'estérification par exemple (275) . Ces cénapses ne se comportaient donc pas tout à fait comme les cénapses naturelles .

On pouvait cependant penser, à la suite de ces recherches, que le cholestérol ajouté ne pouvait se fixer que s'il trouvait une place libre sur les protéines ; c'est bien le cas lorsqu'une fraction du cholestérol naturel migre sur un autre "support" .Cette notion de "place libre" , étudiée par Tayeau et Rolland (303), qui ont pu mesurer la "surface libre" des protéines, a permis à Tayeau et Nivet (300) de fixer des lipides sur des protéines : ces auteurs ont mis , en effet, en évidence la clarification rapide d'un sérum hyperlipémique lactescent, par addition dans certaines conditions de sérum ou de fractions préalablement délipidés, due à la fixation des lipides en excès sur les protéines exemptes de "satellites".

En 1959, Avigan (16) parvient à fixer du cholestérol radioactif dans des lipoprotéines sériques par intermédiaire de cellite. Il signale que ce cholestérol se fixe sur les lipoprotéines de densité comprise entre 1,019 et 1,063 , c'est-à-dire sur les LDL .Avigan note cependant que le cholestérol ajouté ne s'estérifie pas .

Un an plus tard, Whereat et Staple (319) fixent du cholestérol sur les lipoprotéines sériques, grâce au tween 20, sur lequel ils fixent préalablement cet alcool . Le cholestérol se place alors sur les α et sur les β-globulines avec le sérum d'Homme et sur les albumines avec celui de Rat . Mais, cette fois, le cholestérol ainsi ajouté peut s'estérifier au même titre que le cholestérol endogène (319, 37) .

Enfin, Jensen, Aubertin et Tayeau (138) démontrent qu'il est possible de fixer du cholestérol aux lipoprotéines sériques, à

condition que cet alcool se trouve sous forme suffisamment dispersée, ce que l'on obtient par l'intermédiaire des poly-oxy-éthylène-glycols . Le cholestérol ainsi intégré s'estérifie comme le cholestérol endogène et se fixe sur toutes les fractions protéidiques du sérum (Aubertin, Jensen, Blanquet et Tayeau , (15)) .

Les acides gras, qui constituent l'une des formes les plus directement utilisables par les tissus et qui apparaissent dans le sang après action de la lipoprotéine lipase, méritaient d'être étudiés . Selon Robinson, Harris et French (221) , ils se fixent une fois libérés sur la sérum albumine ; cette fraction est celle, en effet, qui offre la surface de fixation la plus grande (292) ; on conçoit ainsi qu'elle puisse être la première à capter les acides gras, comme cela avait déjà été noté (192, 146) . Nous avons estimé cependant que la fixation des acides gras sur les protéines sériques in vitro justifiait une étude systématique ; l'exposé de nos recherches fait l'objet des paragraphes suivants .

Dans un premier temps , nous avons cherché à savoir si l'oléate de sodium se fixait sur toutes les fractions protéidiques du sérum ou bien s'il existait des fractions électives vis-à-vis de cette fixation . Tayeau et Dumon (292) ont montré, en effet, que les globulines une fois délipidées, pouvaient fixer les acides gras aussi bien que les albumines .

Nous avons voulu savoir, dans un second temps, si l'acide gras était fixé aux protéines par des liaisons lâches ou bien par des liaisons stables et si cette fixation était lente ou instantanée . Nous avons envisagé dans un troisième temps le mécanisme de fixation des savons sur les protéines . Voulant alors étudier les modifications apportées aux lipoprotéines par le savon nous avons analysé, dans un quatrième temps , la fixation de l'oléate sur une β-lipoprotéine et nous avons déterminé les points isoioniques des fractions traitées , grâce à l'électrofocalisation .

Enfin, nous avons examiné le comportement d'une β-lipoprotéine humaine au cours de l'incubation à 37° C .

1°- Etude sur le sérum sanguin.

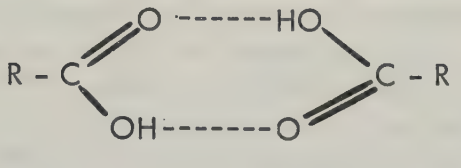
a) Fixation de l'oléate de sodium sur les fractions du sérum sanguin

La réactivité de l'oléate de sodium vis-à-vis des protéines sériques a déjà fait l'objet de travaux antérieurs . Mache - bœuf et Tayeau (177) , au cours de leurs recherches sur l'extractibilité des lipides par l'éther à partir du sérum sanguin additionné de savon, ont constaté que ce dernier se fixait sur les protéines à la place des lipides extraits, en formant ainsi de nouvelles"cénapses" protéines-savon . Plus tard, Mora, Rebeyrotte et Polonovski (186) étudient l'effet produit sur le sérum par l'addition de petites quantités d'oléate de sodium ; ils notent que le savon se fixe plus spécialement sur les α et les β-lipoprotéines ; ces dernières acquièrent alors une plus grande mobilité à l'électrophorèse sur papier . Les auteurs estiment que cette mobilité plus grande est liée à l'apport de la charge anionique supplémentaire de l'acide gras (au pH du sérum, le savon est partiellement dissocié) . Gordon (99) effectue des constatations du même ordre avec l'électrophorèse en veine liquide . Dans leur travail, Mora, Rebeyrotte et Polonovski signalent que le savon ne semble pas se fixer exclusivement sur les lipoprotéines ; il se fixe également sur les protéines et sur l'albumine en particulier ; mais le mode de fixation serait sans doute différent, car les fractions protéidiques associées au savon ne subissent pas de modification de mobilité au cours de l'électrophorèse .

Il est probable que la plus grande mobilité acquise par les lipoprotéines qui ont fixé de l'oléate relève d'un phénomène plus complexe que le simple apport de la charge anionique de l'acide gras .

Le sel de sodium de l'acide gras présente un pK de 4,8 (86) , on peut admettre que, dans ces conditions et compte tenu du pH auquel les expériences ont été réalisées (7,8), 90 p.100 du sel de l'acide gras se trouve à l'état ionisé ; 10 p.100 du savon est donc à l'état d'acide oléique . Mais ce dernier est pratiquement insoluble dans l'eau ; or seule la partie soluble doit être considérée pour l'équilibre ; ainsi ce dernier se déplace continuellement dans le sens

de la formation de l'acide gras. Finalement, il se forme une grosse micelle solvatant les molécules d'acide gras formées et cela d'autant plus que celles-ci sont devenues moins solubles encore, du fait de la formation d'un dimère, grâce à des liaisons hydrogène :



Ainsi, il s'est formé une micelle, dont la surface n'est couverte que par une fraction des groupements ionisés, environ 1 p. 100 (86), et par des groupements hydrophiles ; ces groupements solvatent la presque totalité de l'acide gras . Ce sont ces micelles qui viennent se fixer sur les lipoprotéines .

Il ne s'agit cependant pas, nous semble-t-il, d'une simple fixation directe et il est plausible de penser qu'il se forme une nouvelle micelle dans laquelle l'interface entre le solvant et les deux particules, savon et lipoprotéine, se trouve notablement diminué . Or, il est connu qu'en pareil cas, la modification de structure et l'apport de la grosse molécule renforcent encore l'ionisation de la micelle et font apparaître probablement des groupements ionisés primitivement masqués à l'intérieur de la micelle de savon .

Avant d'aborder notre étude sur la formation des associations protéines-acides gras, nous avons voulu vérifier, dans un premier temps, si le savon se fixe effectivement sur toutes les fractions du sérum, en utilisant des techniques différentes de celles mises en œuvre par ces auteurs . Pour cela , nous avons utilisé une solution d'oléate de sodium préparée à partir d'acide oléique à base de ^{14}C (sur l'atome de carbone n°1) et d'activité spécifique : 51,7 mCi/mM (CEA) . Cette solution mère a été ajoutée à des quantités variables de solution d'oléate de sodium à 1 p. 1000 . Nous avons effectué ainsi plusieurs solutions dont la concentration en oléate marqué variait entre 5×10^{-5} et 5×10^{-4} g /ml. Après un certain nombre d'essais préliminaires, nous avons choisi la solution constituée par 50 µl de la solution mère et 0,2 ml de la solution d'oléate à 1 p. 1000 .

A 0,8 ml de sérum d'Homme, nous ajoutons 40 µl de la solution d'oléate et nous divisons cet échantillon en deux parts (concentration en oléate : $2,5 \times 10^{-4}$ g/ml ; radioactivité : 0,5 µ Ci/mg) . Ces deux parts sont soumises côte à côte à l'électrophorèse (pH 8,6 ; tampon véronal acide/véronal sodique) . Nous obtenons ainsi deux diagrammes : le premier , qui sert de témoin, est coloré par l'amidoschwarz ; le second est découpé en fragments de 0,5 cm de large ; chaque fragment, placé dans un pot à scintillation, est additionné de liquide de scintillation (*) . Les comptages sont alors effectués, ce qui permet de déterminer pour chaque fragment le pourcentage de coups par minute par rapport au total de la radioactivité (**) .

La figure 30 rend compte de nos observations . Elle montre que l'oléate de sodium se fixe effectivement sur toutes les fractions et que la concentration en oléate radioactif est pratiquement fonction de la concentration en protéines, ce qui confirme les conclusions de Mora et coll. (186) .

b) Stabilité de la liaison protéine-oléate

Un problème se pose à propos de ces associations : sont-elles comparables aux associations naturelles ? La liaison protéine-acide gras est-elle lâche ou au contraire stable ? Pour répondre à ces questions, nous avons effectué les expériences suivantes.

Nous avons mis en présence dans une microampoule à décanter, 1 ml de sérum d'Homme et 0,1 ml d'une solution d'oléate de sodium (marqué sur son atome de carbone n°1) à 10 p. 100 . Après mélange, nous ajoutons 2,5 ml d'éther . Nous agitons avec précaution et, après un certain temps de repos (10 minutes) , nous prélevons la totalité de l'éther que nous évaporons . L'extrait éthéré est déposé sur fibre de verre et placé dans un pot à scintillation avec le milieu scintillant . Nous effectuons alors deux mesures de radioactivité , l'une sur l'extrait éthéré, l'autre sur la phase sérique .

(*) POP, 4 g, dimétyl POPOP 0,1 g pour 1 l de toluène.

(**) Nous avons utilisé le compteur à scintillation Inter-Technique type SI 33.

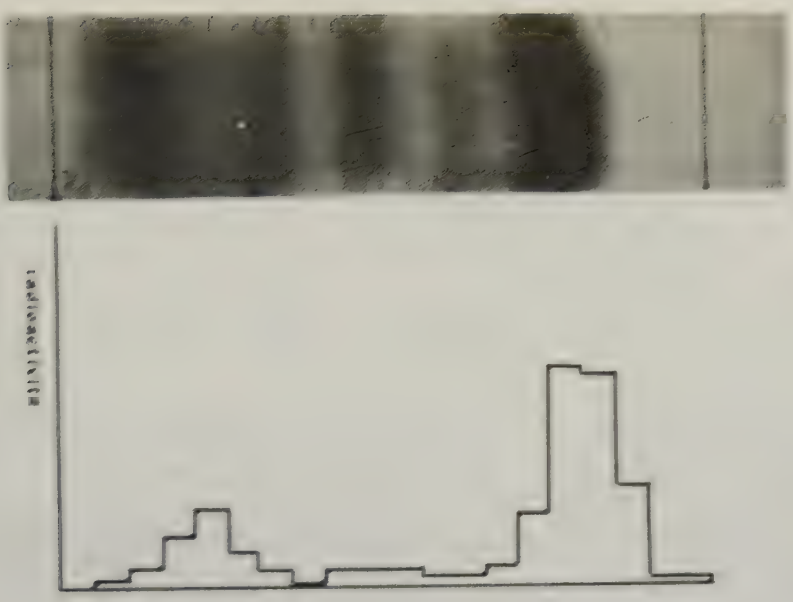


Fig. 30 - Diagramme électrophorétique (protéinogramme) de mélange sérum d'Homme-citrate de sodium radioactif.

a : témoin coloré à l'amidoschwarz
b : mesure de radioactivité

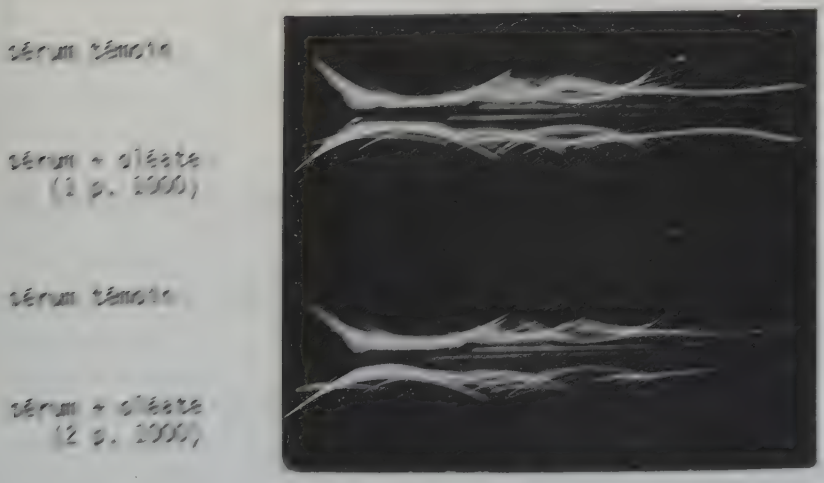


Fig. 31 - Diagramme immunoélectrophorétique. On notera, dans le diagramme du mélange sérum-citrate, la fraction plus avancée à gauche.

Nous avons ainsi réalisé plusieurs expériences en faisant varier les conditions (temps de contact, température) . Le tableau XVII résume les expériences que nous avons réalisées et les résultats que nous avons obtenus .

Tableau XVII

Activité initiale : 115 600 C P M		
Conditions de l'expérience	Activité de la phase éthérée	
	C P M	p.100 du total
Mélange sérum-oléate-éther 15°C ; contact : 10 min.	16720	14
Même mélange contact : 24 h	19830	17
Contact sérum-oléate : 37°C pendant 24 heures. Addition d'éther ; contact : 10 minutes	16525	14
Contact sérum-oléate : 37°C pendant 24 heures . Addition d'éther ; contact : 24 heures	17525	15

Cette série d'expériences permet d'émettre deux conclusions :

1- les liaisons unissant les protéines à l'acide gras sont relativement stables, puisque l'éther ne peut pas extraire plus de 14 à 17 p.100 d'oléate .

2- la fixation est extrêmement rapide, puisqu'après des contacts prolongés, à la température ordinaire et à la température de 37°C, la quantité d'oléate radioactif extrait par l'éther est sensiblement la même .

c) Mode de fixation de l'oléate sur les protéines

Le fait que l'oléate se fixe très rapidement sur les fractions protéidiques et lipoprotéidiques du sérum ne sous-entend pas que des modifications ultérieures ne puissent se produire au sein du sérum entre l'oléate et les protéines . Les travaux de Mora, Rebeyrotte et Polonovski , précédemment cités, ont prouvé que le diagramme électrophorétique des nouvelles cénapses formées était modifié par rapport au témoin . Il est possible que cette modification ne soit pas instantanée et soit accompagnée d'autres phénomènes. C'est ce que nous avons voulu vérifier .

Pour cela, nous avons mis en œuvre d'abord l'immunoélectrophorèse classique, ensuite l'immunoélectrophorèse bi-dimensionnelle dont la sensibilité permet d'observer des phénomènes invisibles avec d'autres techniques .

1- Dans un premier essai, nous avons effectué plusieurs mélanges de sérum et de quantités variées de solution aqueuse d'oléate de sodium à 10 p. 100 . Les mélanges effectués ont été les suivants :

- n°1 = 1 ml de sérum + 0,2 ml d'eau physiologique
- n°2 = 1 ml de sérum + 0,1 ml de sol. d'oléate + 0,1 ml d'eau physiologique
- n°3 = 1 ml de sérum + 0,2 ml de sol. d'oléate .

Chaque mélange a été laissé en contact, puis soumis à l'immunoélectrophorèse . Dans l'un des trous latéraux, nous plaçons le sérum témoin et dans l'autre le mélange sérum-oléate de sodium . Après avoir effectué la migration de ces deux dépôts dans la cuve d'électrophorèse, nous enlevons la gélose de la fente centrale et nous y plaçons l'antisérum polyspécifique d'Homme. Nous laissons diffuser pendant 24 heures, nous lavons avec du Cl Na 0,15 M et , après séchage, nous colorons à l'amidoschwarz .

Cette première expérience (fig. 31) met en évidence l'accélération de la migration qui porte sur les β-lipoprotéines et sur tout sur les α-lipoprotéines . L'accélération est plus élevée lorsque

la quantité d'oléate mise en jeu est elle-même plus grande .Cette conclusion est en parfait accord avec celle de Mora et coll. qui, par électrophorèse sur papier, avaient constaté le phénomène .

2 - Une seconde série d'essais va mettre en jeu l'immuno-électrophorèse bi-dimensionnelle .

Nous avons effectué l'opération en utilisant quatre mélanges :

- n°1 = 1 ml de sérum + 0,2 ml eau physiologique (témoin)
- n°2 = 1 ml de sérum + 0,05 ml de sol. d'oléate + 0,15 ml d'eau physiologique
- n°3 = 1 ml de sérum + 0,1 ml de sol. d'oléate + 0,1 ml d'eau physiologique
- n°4 = 1 ml de sérum + 0,2 de sol. d'oléate .

Après un certain temps de contact (10 minutes), chacun de ces mélanges a été traité suivant la technique précédemment décrite (voir page 69) . Nous avons utilisé d'une part le mélange sérum-oléate de sodium, d'autre part l'immunsérum . Les figures 32, 33,34 et 35 rendent compte des résultats que nous avons obtenus.

Ces divers essais mettent nettement en évidence les phénomènes mentionnés précédemment ; on aperçoit,en effet, dans les fig. 32,33,34,35, la même fraction qui devance les albumines dans la migration et cela d'autant plus que la quantité d'oléate mise en jeu a été plus élevée .

Cette fraction correspond à l' α_1-lipoprotéine, ainsi qu'on peut le constater à l'aide du schéma de la figure 36 qui reproduit le diagramme de la fig. 32, avec identification des différentes fractions . On notera que la β-lipoprotéine a également migré plus loin, ce qui confirme les observations précédentes .

Mais le phénomène le plus intéressant que nous ayons mis en évidence est constitué par l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle du mélange n°4 laissé préalablement cette fois pendant 72 heures à l'incubation à 37°C . Dans ces conditions, on s'aperçoit (fig.37) que la fraction, qui précédemment devançait les albumines,

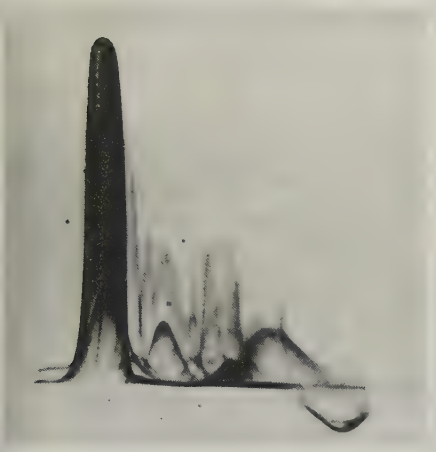


Fig. 32 - Diagramme immunoélectrophorétique bidimensionnel du témoin.

Fig. 33 - Diagramme immunoélectrophorétique bidimensionnel du mélange sérum-oléate (0,5 p. 1000)

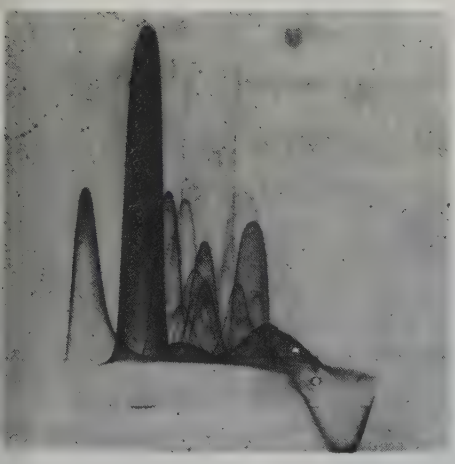


Fig. 34 - Diagramme immunoélectrophorétique bidimensionnel du mélange sérum-oléate (1 p. 1000)

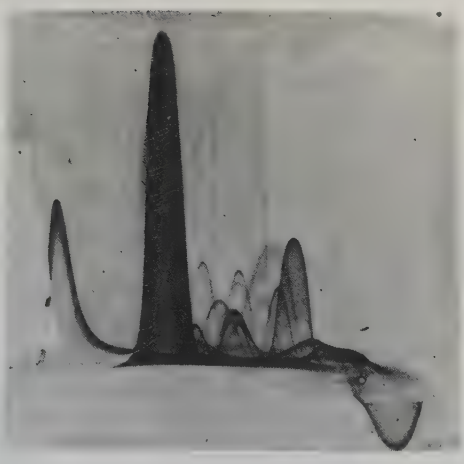
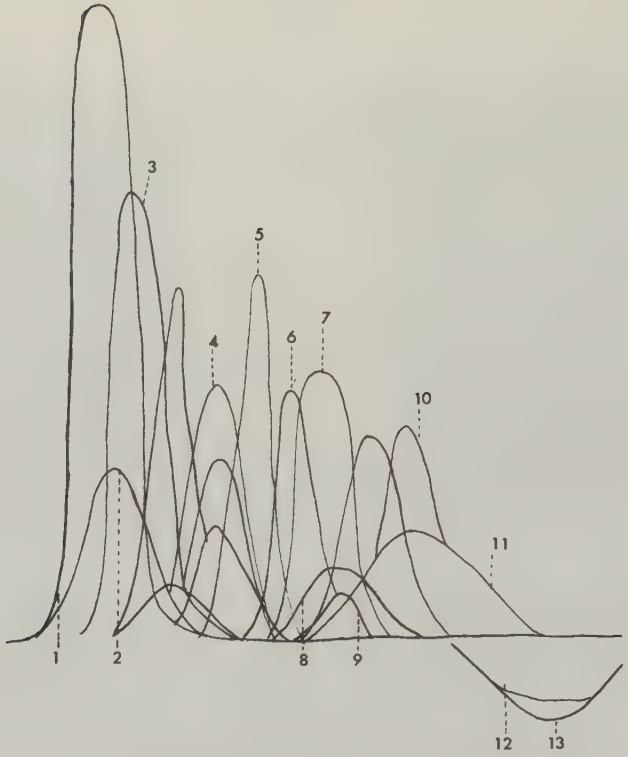


Fig. 35 - Diagramme immunoélectrophorétique bidimensionnel du mélange sérum-oléate (2 p. 1000)



1- Albumine
2- α_1-lipoprotéine
3- α_1-antitrypsine
4- Haptoglobine
5- Gc-globuline
6- α_2-macroglobuline
7- Transferrine
8- Céruloplasmine
9- β_1-lipoprotéine
10- Hémopexine
11- Ig A
12- Ig M
13- Ig G

Fig. 36 - Schéma reproduisant le diagramme de la fig. 32

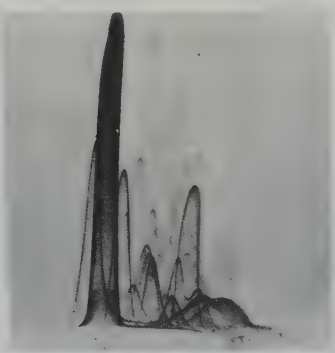


Fig. 37 - Diagramme immunoélectrophorétique bidimensionnel du mélange sérum-oléate (2 p. 1000), laissé préalablement pendant 72 heures à la température 37°C.

a disparu . Cette fraction se retrouve, à peu de choses près, à son niveau primitif .

Nous avons répété plusieurs fois cette expérience et le phénomène a toujours été confirmé . Cette notion mérite, il nous semble, d'être extrapolée aux phénomènes qui se passent dans l'organisme au cours de la période post-prandiale . On sait, en effet, que les triglycérides absorbés ou synthétisés dans l'intestin arrivent dans la veine sous-clavière gauche en provenance du canal thoracique sous forme de chylomicrons et de VLDL . Ces fractions sont alors attaquées par la lipoprotéine lipase (facteur clarifiant) qui hydrolyse les triglycérides et libère ainsi les acides gras .Ces derniers se fixeront provisoirement sur la sérum albumine (Robinson (220)) , avant d'être captés par les tissus . Or il ne semble pas que leur présence modifie le diagramme électrophorétique du sérum par rapport au témoin . Le sérum possède sans doute la propriété de masquer ces acides gras par un mécanisme du type de celui que nous venons de mettre en évidence .

2°- Etude sur la β-lipoprotéine.

Les précédentes observations ont porté sur le sérum total , qui constitue un mélange hétérogène de protéines : des interférences peuvent intervenir au sein d'un tel mélange .Pour cette raison, nous avons effectué une nouvelle série d'essais portant cette fois sur une β-lipoproteine humaine préparée et testée suivant les techniques précédemment indiquées (voir p.68) .

C'est ainsi que nous avons étudié d'abord l'affinité de la β-lipoprotéine pour l'oléate ; nous avons envisagé ensuite le comportement électrophorétique du complexe β-lipoprotéine-oléate . Nous avons enfin déterminé le pH isoionique de ces complexes par électrofocalisation .

a) Affinité de la β-lipoprotéine humaine pour l'oléate de sodium .

Nous avons préparé un certain nombre de mélanges de solutions de β-lipoprotéine humaine et d'oléate de sodium .

La β-lipoprotéine que nous avons utilisée en solution, en présence de chlorure de sodium 0,15 M, renferme 12,6 mg de lipides et 4 mg de protéine par ml. Les solutions d'oléate de sodium étaient constituées comme suit :

- 1) 0,2 ml de solution d'oléate de sodium à 1 p.100 et 5 µl de solution d'oléate de sodium(marqué par du ^{14}C sur le premier atome de carbone de l'acide oléique) à 3 mg par ml . Le titre de la solution ainsi préparée, compte tenu de la faible quantité relative d'oléate marqué ajouté, est très voisin de 1 p. 100 .

- 2) 0,2 ml de la solution d'oléate de sodium à 1 p.100 et 5 µl de solution d'oléate de sodium marqué (3 mg par ml). Le titre de cette seconde solution est approximativement à 1 p.1000 .

On effectue alors un certain nombre de mélanges β-lipoprotéine - oléate de sodium ; certains de ces mélanges sont soumis à l'incubation à 37°C pendant des temps variés . Des diagrammes électrophorétiques vont alors être réalisés , parallèlement à ceux obtenus avec les solutions d'oléate de sodium (témoins) .

On prépare les solutions suivantes :

a - solution fraîchement préparée d'oléate de sodium radioactive à 1 p.1000

b - même solution incubée à 37°C pendant 24 heures

c - même solution incubée à 37°C pendant 72 heures

d - solution fraîchement préparée d'oléate de sodium radioactive à 1 p. 100

e - même solution incubée à 37°C pendant 24 heures

f - même solution incubée à 37°C pendant 72 heures

g - mélange β-lipoprotéine et solution d'oléate de sodium à 1 p. 1000 , fraîchement préparé .

h - même mélange incubé à 37°C pendant 24 heures

i - mélange β-lipoprotéine-oléate de sodium à 1 p.100 fraîchement préparé

j - même mélange incubé à 37°C pendant 24 heures

k - même mélange incubé à 37°C pendant 72 heures .

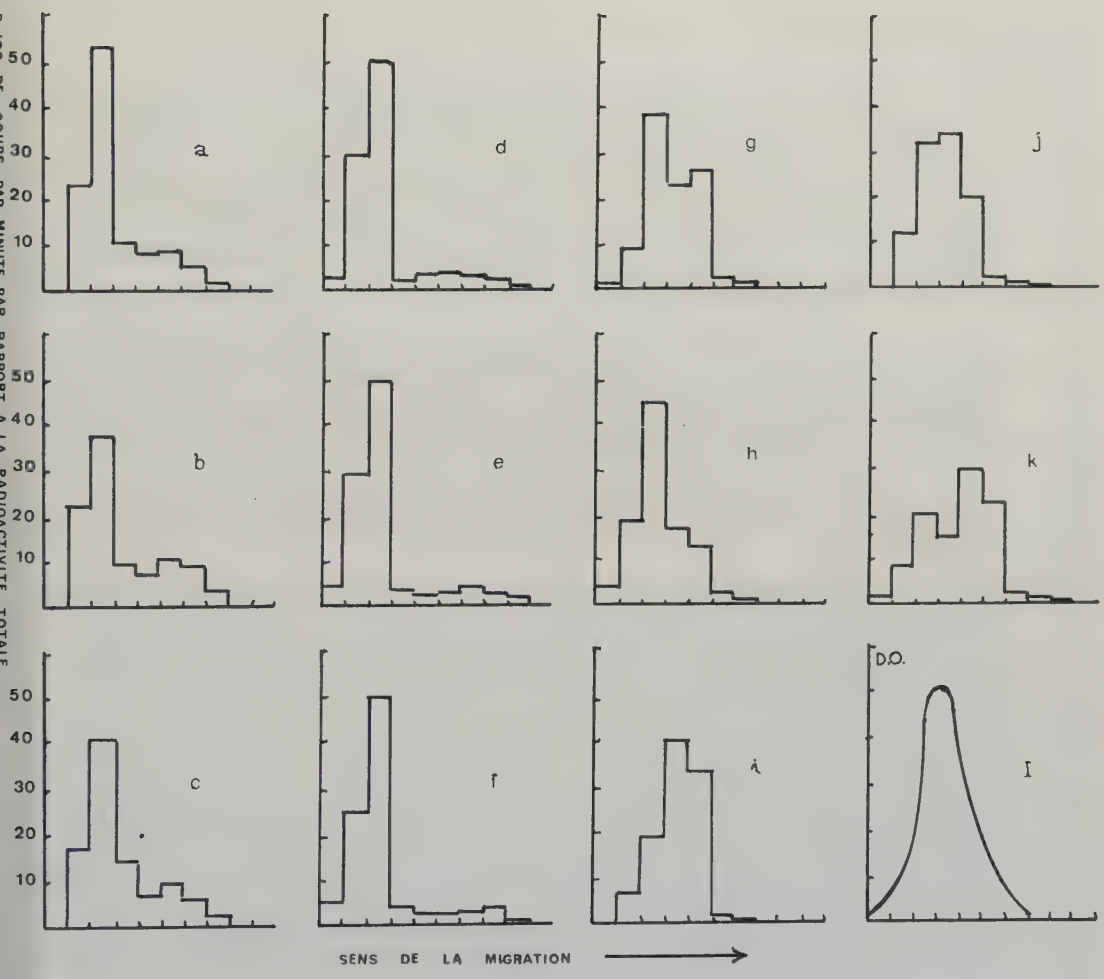


Fig. 38 - Diagrammes représentatifs des variations de la radioactivité (p. 100 de coups par minute) en fonction de la distance parcourue (en cm) :

a à f : solution d'oléate de sodium
g à k : mélanges β-lipoprotéine-oléate de sodium
l : témoin : courbe d'absorption de la β-lipoprotéine seule

Ces divers mélanges, ainsi que la solution de β-lipoprotéine pure, sont soumis à l'électrophorèse sur papier . Nous disposons ainsi d'une batterie de 12 électrophorèses (6 correspondant à l'oléate de sodium, incubé ou non ; 5 correspondant aux mélanges β-lipoprotéine-oléate incubé ou non ; 1 correspondant à la β-lipoprotéine pure) .

Le diagramme correspondant à la β-lipoprotéine est séché et coloré par l'amidoschwarz et sert de témoin .Les autres diagrammes sont découpés en fragments de 1 cm de largeur et servent aux mesures de radioactivité .

Les schémas de la figure 38 correspondent aux enregistrements .

On constate au premier abord que la majeure partie de la radioactivité a tendance à se concentrer dans la région correspondant à la place de la β-lipoprotéine . Mais le phénomène apparaît plus nettement lorsque l'on calcule pour chaque segment la différence de radioactivité entre l'oléate de sodium (témoin) et le mélange lipoprotéine-oléate . Le tableau XVI indique les valeurs obtenues . On note dans certains segments une différence fortement positive et dans d'autres une différence négative . Les secondes correspondent à un "départ" de radioactivité dans des segments différents de ceux où siègent les β-lipoprotéines , alors que les premières correspondent, au contraire - il est facile de le constater par comparaison avec le témoin - aux régions où se situe la β-lipoprotéine . Les courbes de la figure 39, qui représentent pour une concentration en oléate de 1 p.100 les variations de la différence de radioactivité en fonction de la distance parcourue depuis le point de départ, illustrent ces constatations .

Tableau XVI

N° des segments	Différence de radioactivité entre la solution d'oléate et le mélange β-lipoprotéine-oléate Titre de la solution d'oléate : 1 p. 100		
	Mélange fraîchement préparé	Incubation 24 h	Incubation 72h
1	- 2	- 3	- 4
2	- 23	- 18	- 16
3	- 31	- 18	- 29
4	+ 37	+ 30	+ 10
5	+ 30	+ 17	+ 27
6	- 3	- 1	+ 18
7	- 4	- 3	- 2
8	- 2	- 3	- 4
9	- 1	- 2	- 1
10	0	- 1	0

Ces résultats prouvent donc que l'oléate de sodium se fixe très facilement sur la β-lipoprotéine et cette fixation est instantanée, ainsi que le prouvent les trois courbes de la figure 39 : après 24 et même 72 heures d'incubation à 37°C, la fixation est identique à celle du mélange fraîchement préparé .

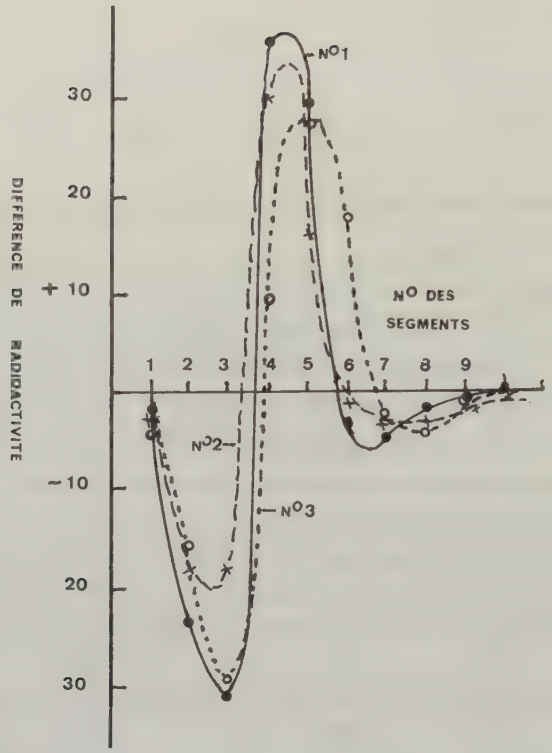
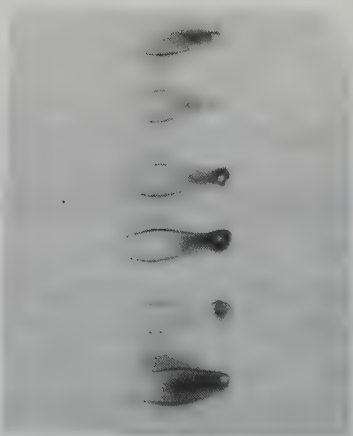


Fig. 39 - Courbes représentatives des variations de la différence de radioactivité entre l'oléate de sodium radioactif et le mélange oléate de sodium radioactif - β-lipoprotéine en fonction du chemin parcouru au cours de l'électrophorèse.

courbe n° 1 - mélange fraichement préparé (points)
courbe n° 2 - mélange incubé 24 heures à 37° (croix)
courbe n° 3 - mélange incubé 72 heures à 37° (cercles)



1. témoin
2. pas d'incubation
3. incubation 24 h.
4. incubation 48 h.
5. incubation 72 h.
6. incubation 96 h.

Fig. 40 - Diagrammes immunoélectrophorétiques

b) Comportement électrophorétique des complexes β-lipoprotéine -oléate de sodium

Il nous a paru utile de savoir si le phénomène que nous avons observé précédemment avec le sérum total - à savoir la "remise en place" des fractions de vitesse accélérée après 72 heures d'incubation - se produisait également avec la β-lipoproteine pure .

Nous avons utilisé une solution de β-lipoprotéine (1 ml) renfermant 20 mg de lipides : à cette solution, nous avons ajouté de l'oléate de sodium à 10 p.100 (0,04 ml) ; ainsi la concentration finale en oléate est de 2 p.1000 .

Cette solution a été divisée en plusieurs fractions avant d'être soumise à l'immunoélectrophorèse : une part sert de témoin, une autre est traitée immédiatement, une troisième est préalablement incubée à 37°C pendant 24 heures, une quatrième est incubée pendant 72 heures, une cinquième enfin est incubée pendant 96 heures .

Les immunoélectrophorèses sont effectuées suivant la technique précédemment indiquée (voir p.69) . Dans les trous latéraux, nous plaçons le mélange sérum-oléate d'une part, le sérum témoin d'autre part et dans la gouttière centrale l'immunsérum monospécifique anti β-lipoprotéine . La figure 40 rend compte des diagrammes que nous avons obtenus :

L'examen des diagrammes,dont la migration est facilement repérable en notant le milieu de l'arc, permet de retrouver une fraction accélérée pour une incubation de 24 et 48 heures , mais une migration identique au témoin pour une incubation de 72 heures et 96 heures . Nous retrouvons donc en tous points, avec une β-lipoprotéine pure, le phénomène que nous avons constaté avec le sérum total .

Comment expliquer ce phénomène ? On peut supposer que, dans un premier temps, l'oléate se fixe sur les apoprotéines ou sur des chaînes aliphatiques de lipides par des forces physiques, du type forces de Van der Waals . Cela paraît plausible , lorsque l'on fait appel aux conceptions de Mateu et coll. (188) ou à celles

de Finer et coll. (83) (voir p.41), selon lesquelles les apoprotéines occupent une situation superficielle dans la molécule de LDL . Dans ces conditions, l'anion gras (car au pH du milieu, le savon est dissocié) apporte à la particule la charge de son groupe carboxylique, qui vient s'ajouter ainsi à l'ionisation en majorité négative de la lipoprotéine (qui se trouve à un pH supérieur à son point isoélectrique) . Ainsi, la charge négative étant plus élevée, la fraction migre plus loin . Mais, au cours de l'incubation à 37°C, la charge du carboxyle se trouve peu à peu atténuée : il n'est pas impossible dès lors que ce carboxyle se combine soit avec des groupes ω-aminés de l'apoprotéine, soit éventuellement avec des groupes basiques des molécules de phospholipides, qui, dans les deux théories précitées, occuperaient également une position superficielle . On s'expliquerait alors la raison pour laquelle on n'observerait plus cette accélération de la fraction . L'acide gras finirait par se fixer sur les lipoprotéines (α et β) de la même façon que sur les protéines; nous avons vu , en effet, précédemment que l'acide gras se fixait sur toutes les fractions du sérum, même exemptes de lipides . Seules les fractions porteuses de lipides connaissent le phénomène précédemment décrit . Peut-être se produit-il un "remaniement" des molécules permettant à l'acide gras de se fixer sur les protéines des lipoprotéines, ce qui au début ne paraissait pas possible ?

Si cette hypothèse sur la neutralisation des carboxyles est bien fondée, le pH isoionique du mélange β-lipoprotéine-oléate de sodium doit évoluer avec le temps d'incubation . Nous avons cherché à le vérifier en effectuant sur ce mélange des expériences d'électrofocalisation .

c) Etude du mélange β-lipoprotéine-oléate de sodium par électrofocalisation

Nous avons choisi d'étudier deux mélanges incubés pendant des temps différents, le premier pendant 24 heures et le second pendant 48 heures . Chacun de ces mélanges a été introduit dans l'appareil d'électrofocalisation (ampholine pH 3,5 - 10) . Les courbes des figures 40 (β-lipoprotéine seule), 41 et 42, qui correspondent aux variations du pH en fonction de la numérotation des fractions, présentent trois pics, conformément aux travaux classiques sur l'électrofocalisation des β-lipoprotéines (233) . Dans la courbe

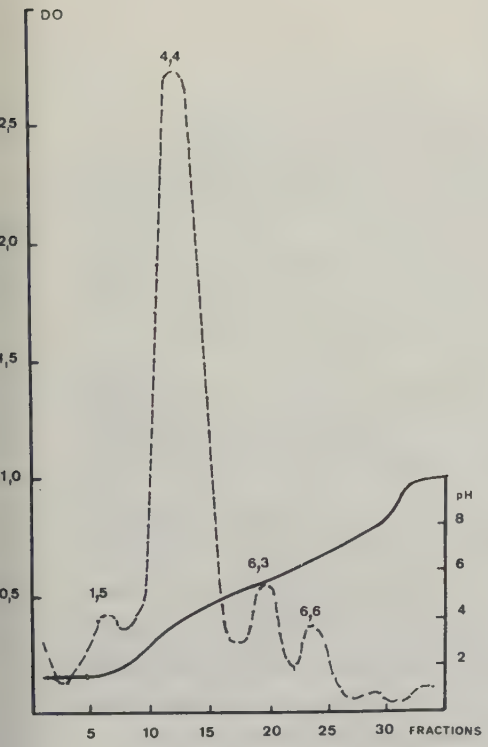


Fig. 41 - Electrofocalisation de la β-lipoprotéine

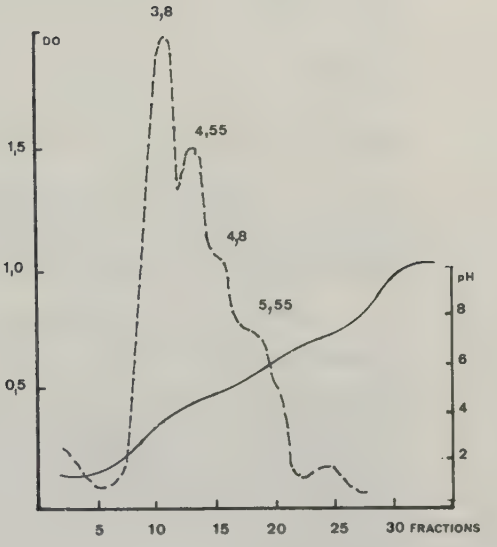


Fig. 42 - Electrofocalisation du mélange β-lipoprotéine-oléate de sodium incubé 24 heures.

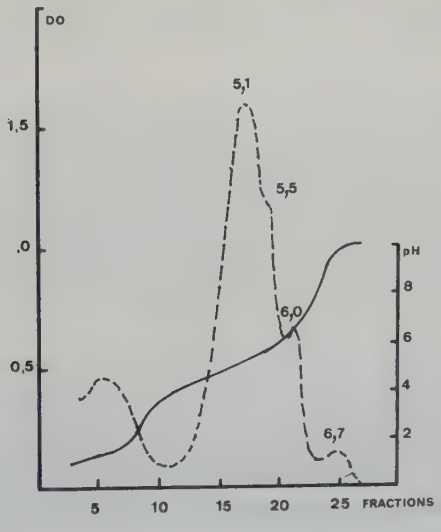


Fig. 43 - Electrofocalisation du mélange β-lipoprotéine-oléate de sodium incubé 48 heures.

de la figure 42 (incubation de 24 heures), le pic principal a diminué de 0,6 unité pH par rapport au pic d'origine ; il est, en effet, de 3,8 au lieu de 4,4 . Dans la courbe de la figure 43 correspondant à une incubation de 48 heures, nous constatons que ce même pic se situe à pH 5,1 ; nous avons donc, au contraire, une augmentation qui est de 0,7 unité pH par rapport au témoin.

L'hypothèse que nous avons émise se trouve donc vérifiée : le pH isoélectrique de la fraction traitée diminue tout d'abord pour reprendre ensuite une valeur voisine de celle du témoin.

Il convient néanmoins de remarquer qu'après le même temps d'incubation, l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle présentait encore une fraction accélérée . Cela n'est pas surprenant, car il est bien connu que la migration électrophorétique ne dépend pas exclusivement du pH isoélectrique (voir 233) . Cette expérience montre néanmoins les modifications graduelles que subissent les mélanges lipoprotéine -oléate au cours de l'incubation .

B - COMPORTEMENT D'UNE β - LIPOPROTEINE A L'INCUBATION A 37° C

L'incubation à 37° C a été bien souvent mise en jeu pour l'étude du métabolisme des diverses lipoprotéines : elle place , en effet, ces substances dans des conditions réalisées in vivo . Grâce à cette technique, il a été possible de mettre en évidence les échanges de lipides et même d'apoprotéines qui s'effectuent entre les fractions lipoprotéidiques .

Ainsi que nous l'avons rappelé plus haut, la lécithine : cholestérol-acyl-transférase (LCAT), qui est localisée dans les α-lipoprotéines, possède la propriété, à l'incubation, d'hydrolyser en β les lécithines des HDL, son substrat, et de transférer l'acide gras libéré sur le cholestérol libre des VLDL (92), transformant ainsi ce dernier en cholestérol estérifié . Ces diverses substances lipidiques entraînent d'ailleurs souvent avec elles des apoprotéines ou des fragments d'apoprotéines (151) . En même temps que s'effectuent ces passages, il se fait aussi un échange de triglycérides entre les VLDL

d'une part et les LDL et HDL d'autre part . Ces "remaniements " qui se font entre les divers lipides et qui se trouvent liés à l'ac - tion de la LCAT, avaient été signalés, dès 1955, par Tayeau et Nivet (298) , qui les avaient mis en évidence grâce à l'électro - phorèse sur papier à pH 8,6 ; ces auteurs , nous l'avons rappelé plus haut (voir p.101) avaient constaté qu'après incubation, les α et surtout les β-lipoprotéines migraient plus loin que le témoin . Cette constatation peut s'expliquer ainsi : la technique au noir Soudan, utilisée par ces auteurs pour révéler les lipoprotéines, caractérise principalement les triglycérides ; or, ceux-ci, qui se trouvaient pour une grande part sur les VLDL , qui se conduisent comme des pré β-lipoprotéines, passent en partie tout au moins sur les HDL, qui se comportent comme des α - globulines .

Quoi qu'il en soit, la LCAT ne peut donc intervenir que dans un mélange renfermant des α-lipoprotéines (où elle se situe), des HDL, son substrat (*) et des VLDL, nécessaires à la réception des esters de cholestérol formés .

Nichols et coll. (191) d'une part, Tayeau et coll. (305) d'autre part, ayant signalé que d'autres phénomènes se produisaient au cours de l'incubation du sérum, nous avons voulu étudier le comportement à l'incubation d'une β-lipoprotéine seule, fraction constituant la majeure partie des LDL (214) .

1°- Etude chimique et électrophorétique de la β- lipoprotéine pure incubée .

Nous avons préparé une β - lipoprotéine à partir du sérum d'Homme , en utilisant la technique que nous avons exposée précédemment (voir page 68) . Nous avons ensuite testé cette

(*) Certains auteurs admettent que, contrairement aux données classiques, les HDL ne seraient peut-être pas le seul substrat de la LCAT ; il ne serait pas impossible que les LDL et même les VLDL puissent s'associer aux HDL et former des complexes sur lesquels agirait alors la LCAT (voir 211).

β - lipoprotéine à l'aide de l'électrophorèse, de l'immunoélectrophorèse monodimensionnelle et bi-dimensionnelle, de l'ultracentrifugation et de l'électrofocalisation (voir page 71) . Cette β- lipoprotéine peut être considérée comme pure et nullement souillée par des fractions voisines .

La concentration de la solution risquant de jouer un rôle , nous avons mis en œuvre dans nos expériences, des concentrations différentes suivant les essais réalisés . Les diverses solutions, dont une partie est conservée comme témoin, sont placées stérilement en ampoules scellées sous azote et laissées à l'étuve à 37 ° C pendant 72 heures .Nous notons alors qu'au cours de cette incubation, les solutions augmentent de viscosité et cela d'autant plus que la concentration en lipoprotéine est plus élevée .

Nous réalisons trois séries d'expériences :l'une sert aux dosages chimiques, la seconde à l'électrophorèse et la troisième à l'électrofocalisation .

a) Etude chimique

Pour cette étude, nous avons effectué des dosages de cholestérol, libre et estérifié .

Le dosage du cholestérol total a été effectué sur l'extrait lipidique suivant la technique précédemment décrite (voir p.57). Pour la détermination des deux variétés de cholestérol libre et estérifié, nous avons utilisé cette fois la technique chromatographique , qui nous a fourni de bons résultats et qui consiste à adsorber le cholestérol sur de l'alumine ; une élution à l'aide d 'éther de pétrole élimine le cholestérol estérifié ; on dose alors le cholestérol libre après récupération à l'aide d'une élution avec du chloroforme .

Pour réaliser ce dosage, on commence par extraire les lipides de la fraction lipoprotéidique à l'aide du mélange méthylal-méthanol : on effectue ensuite une extraction chloroformique.

La colonne chromatographique est préparée de la façon suivante : elle comporte à sa base un tampon de coton de verre au-dessus duquel on verse 50 ml d'éther de pétrole . Sur ce solvant, on laisse tomber en "pluie fine" 10 g d'alumine (*) . Après tassement, l'alumine est recouverte de coton de verre . On laisse alors s'écouler lentement l'éther de pétrole, puis on rince l'alumine avec 120 ml de chloroforme qu'on laisse également s'écouler goutte à goutte ; on rince encore une fois avec 50 ml d'éther de pétrole . La colonne est alors prête pour le dosage .

1 ml de la solution chloroformique de l'extrait lipidique est additionné de 15 ml d'éther de pétrole, puis de 5 ml de ce même solvant ayant servi au rinçage de la fiole ayant contenu l'extrait lipidique . Ces solutions sont versées dans la colonne. Dans ces conditions, tout le cholestérol se fixe sur l'alumine . Une élution à l'aide de 80 ml d'éther de pétrole va provoquer l'entraînement du cholestérol estérifié, tandis que le cholestérol libre reste fixé sur l'adsorbant . Une nouvelle élution à l'aide de 80 ml de chloroforme permet la récupération de ce cholestérol libre . Après évaporation du solvant, le cholestérol est dosé sur le résidu par colorimétrie .

Nous avons effectué ainsi trois séries d'expériences . Le tableau XVIII réunit les résultats que nous avons obtenus dans chaque expérience, en fonction des concentrations mises en jeu .

(voir Tableau XVIII, page suivante)

(*) Alumine Merck 90.

Tableau XVIII

Expérience	Temps d'incubation	concentration de la β-lipoprotéine en lipides (g / l)	cholestérol total (g/l)	cholestérol estérifié (g/l)	cholestérol libre (g/l)
I	0 (T)	6,0	2,50	1,60	0,90
	72 h	6,0	2,40	1,70	0,70
	72 h	1,2	0,46	0,30	0,16
	72 h	0,6	0,24	0,16	0,08
II	0 (T)	7,0	3,00	1,88	1,12
	72 h	7,0	2,72	1,88	0,84
	72 h	1,4	0,60	0,36	0,24
	72 h	0,7	0,30	0,19	0,11
III	0 (T)	6,0	2,08	1,30	0,78
	72 h	6,0	2,12	1,42	0,70
	72 h	0,6	0,19	0,12	0,07

Afin de pouvoir discuter le rôle de la concentration en lipides de la solution de β-lipoprotéine, nous avons ramené nos résultats de chaque expérience à la concentration primitive d'où nous étions partie, soit 6 g par litre . Le tableau XIX permet les comparaisons .

(tableau XIX, page suivante)

Tableau XIX

Expériences	Temps d'incubation	concentration primitive de la β - lipoprotéine en lipides (g/l)	cholestérol total (g/l)	cholestérol estérifié (g/l)	cholestérol libre (g/l)
I	0 (T)	6,0	2,50	1,60	0,92
	72 h	6,0	2,40	1,72	0,70
	72 h	1,2	2,30	1,50	0,80
	72 h	0,6	2,40	1,60	0,80
II	0 (T)	7,0	3,04	1,88	1,16
	72 h	7,0	2,72	1,88	0,84
	72 h	1,4	3,00	1,80	1,20
	72 h	0,7	3,00	1,90	1,10
III	0 (T)	6	2,08	1,30	0,78
	72 h	6	2,00	1,40	0,70
	72 h	0,6	1,90	1,20	0,70

Ces résultats permettent deux constatations :

1- Il ne se produit aucune estérification du cholestérol, la différence observée entre le témoin et l'échantillon incubé étant de l'ordre de grandeur de l'erreur permise avec ce type de dosage . Cela ne doit pas nous étonner, puisque notre β-lipoprotéine purifiée ne doit contenir ni LCAT, ni son substrat (*) .

(*) Comme nous l'avons signalé précédemment, certains auteurs admettent que, dans certaines conditions, les LDL pourraient constituer un substrat pour la LCAT (voir 211).

2- La dilution du milieu ,qui varie de 1 à 10 dans nos expériences, ne peut pas être interprétée,puisqu'il n'apparaît pas d'estérification .

b) Etude électrophorétique

On pourrait penser, à la suite des résultats précédents, qu'il est inutile d'effectuer ces expériences d'électrophorèse,puisque les modifications observées au cours de l'incubation se trouvent liées à l'estérification du cholestérol qui ne se produit pas ici. Malgré cela, nous avons réalisé quand même un essai consistant à effectuer le diagramme électrophorétique de la β-lipoprotéine , avant et après incubation à 37° C pendant 72 heures .

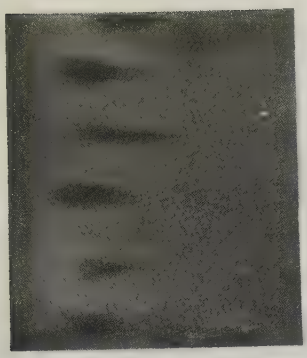
Pour cela, nous avons mis en œuvre trois solutions de β -lipoprotéines à des concentrations différentes : la première renferme 47 mg de lipides par ml, la seconde en contient 31 mg et la troisième 4,7 mg. Chacune de ces trois solutions est divisée en deux parts : la première sert de témoin et la seconde, mise en ampoule scellée, est soumise à l'incubation .

Les six solutions, trois témoins et trois solutions incubées , sont alors soumises à l'électrophorèse sur agarose (*) et en tampon véronal à pH 8,6 . Les diagrammes de la figure 44 mettent en évidence les résultats que nous avons obtenus .

Ils montrent, contrairement à ce que nous aurions pu attendre, qu'il se produit un changement dans la migration électrophorétique , comparable à celui obtenu avec le sérum total et cette migration est d'autant plus importante que la concentration en lipides est plus élevée . La traînée observée avec les échantillons incubés correspond certainement à une dénaturation partielle,que nous avons d'ailleurs signalée au début .

Voulant savoir si cette migration assez inattendue avait un rapport avec une action éventuelle de la LCAT, nous avons effectué une nouvelle expérience,mais cette fois en présence d'inhibiteurs de cet enzyme.Nous avons utilisé trois inhibiteurs :

(*) Interbiose A 37, Industrie biologique française.



1 témoin (concentration : 47 mg/mℓ)

2 incubation (concentration : 47 mg/mℓ)

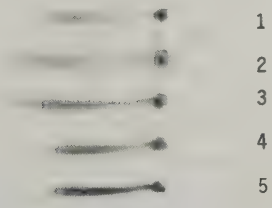
3 témoin (concentration : 31 mg/mℓ)

4 incubation (concentration : 31 mg/mℓ)

5 témoin (concentration : 4,7 mg/mℓ)

6 incubation (concentration : 4,7 mg/mℓ)

Fig. 44 - Diagrammes électrophorétiques d'une β-lipoprotéine incubée ou non et à diverses concentrations.



1 : Témoin

2 : incubation (concentration : 0,01 M)

3 : incubation (concentration : 0,05 M)

4 : incubation (concentration : 0,01 M)

5 : incubation (concentration : 0,02 M)

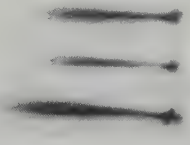
Fig. 45 - Diagrammes électrophorétiques d'une β-lipoprotéine, additionnée de p-hydroxy-mercuribenzoate de sodium à diverses concentrations et soumise à l'incubation.

1 : témoin non incubé

2 : incubation en présence de N éthyl-maléimide (0,01 M)

3 : incubation en présence d'acide 5,5' di-thio-bis-2-nitro-benzoïque

Fig. 46 - Diagrammes électrophorétiques d'une β-lipoprotéine additionnée de N éthyl-maléimide ou d'acide 5,5' di-thio-bis-2-nitro-benzoïque (0,01 M) puis incubée.



1 : témoin

2 : mélange incubé : p-hydroxy-mercuri-benzoate de sodium (0,01 M) et β-mercapto-éthanol (0,01 M)

3 : mélange incubé : p-hydroxy-mercuri-benzoate de sodium (0,01 M) et β-mercapto-éthanol (0,1 M)

Fig. 47 - Diagramme électrophorétique d'une β-lipoprotéine additionnée de p-hydroxy-mercuri-benzoate de sodium et de son inhibiteur à deux concentrations différentes.

1- le p -hydroxy-mercuribenzoate de sodium

2- la N-éthyl-maléimide

3- l'acide 5, 5' di-thio-bis-2 nitrobenzoïque

La solution de β-lipoprotéine mise en jeu renfermait 31 mg de lipides par ml . Nous avons effectué une première expérience avec le p -hydroxy-mercuribenzoate de sodium, que nous avons ajouté à la solution de β-lipoprotéine, afin d'obtenir quatre concentrations finales différentes : 0,001 M, 0,005 M, 0,01M et 0,02 M .

Les mélanges ainsi effectués ont été incubés 72 heures à 37°C, puis soumis à l'électrophorèse . Les diagrammes de la figure 45 rendent compte de nos résultats, en comparaison avec le témoin .

On constate alors qu'aux faibles concentrations (0,001M et 0,005M), la migration se produit comme dans l'expérience précédente . Mais il n'en est plus de même aux concentrations plus élevées (0,01M et 0,02M) . A ces dernières concentrations , il se produit une inhibition, comme dans le cas de la LCAT .

Connaissant maintenant la concentration minimum en inhibiteur nécessaire au blocage de la migration (0,01 M), nous effectuons, à cette même concentration deux expériences, l'une avec la N éthyl-maléimide, l'autre avec l'acide 5,5' thio-bis-2-nitrobenzoïque, autres inhibiteurs classiques de la LCAT . Les diagrammes de la figure 46 rendent compte de nos résultats .

Ils prouvent que les deux nouvelles substances utilisées inhibent le changement de migration de la β-lipoprotéine .

En matière de vérification, nous avons effectué un nouvel essai avec le p -hydroxy-mercuri-benzoate de sodium (0,01 M), mais en présence,cette fois , de β-mercaptoéthanol, qui lève normalement l'inhibition produite par le dérivé mercuriel . Pour cet essai, nous avons mis en œuvre deux concentrations finales différentes en β-mercaptoéthanol : 0,01 M et 0,1 M. Les diagrammes obtenus sont représentés sur la figure 47 .

Ils montrent qu'il faut une concentration de mercapto-éthanol d'au moins 0,1 M pour lever l'inhibition produite par le p -hydroxy-mercuri-benzoate de sodium . Un autre inhibiteur du dérivé mercuriel, le di-thio-érythritol, à la concentration de 0,1M, nous a fourni les mêmes résultats .

Dans ces diverses expériences, nous observons un phénomène a priori paradoxal, à savoir la migration plus avancée de la β-lipoprotéine pure après incubation, sans estérification concomitante du cholestérol, et l'inhibition du phénomène par trois inhibiteurs de la LCAT ! Comme nous l'avons signalé au début, un tel phénomène ne devrait exister qu'en présence de certaines fractions lipoprotéidiques du sérum, différentes de la β-lipoprotéine (constituant des LDL) .

c) Etude en électrofocalisation

En utilisant la technique précédemment décrite (voir p. 71) , nous avons soumis la β-lipoprotéine à l'électrofocalisation avant et après incubation . En comparant la courbe obtenue (après incubation) avec la courbe témoin (avant incubation) (fig. 48et 49), on ne trouve pas a priori de très grandes différences : le pic principal est pratiquement superposable dans les deux courbes ; mais en regardant les courbes de plus près, on trouve une modification concernant les pics secondaires . En effet, les pics correspondant au pHi de6,3 et de 6,6 dans le témoin ont pratiquement disparu et sont remplacés par de très petits pics situés à 5,5 et 6,5 . Quelle signification peut-on donner à cette constatation ?

A-t-on réellement affaire à une fraction pure en dépit des critères que nous avons exposés ? Normalement la courbe de focalisation ionique d'une β-lipoprotéine comporte un pic principal et deux ou trois petits pics secondaires ; ces petits pics pourraient peut-être correspondre à des sous-fractions ou bien même à d'autres fractions : d'ailleurs, certains auteurs, tels Scanu (233), admettent que ces petits pics pourraient être les témoins de la présence d'HDL . Quoi qu'il en soit, ces petits pics disparaissent au cours de l'incubation, alors que le pic principal ne semble pas avoir été affecté par cette opération .

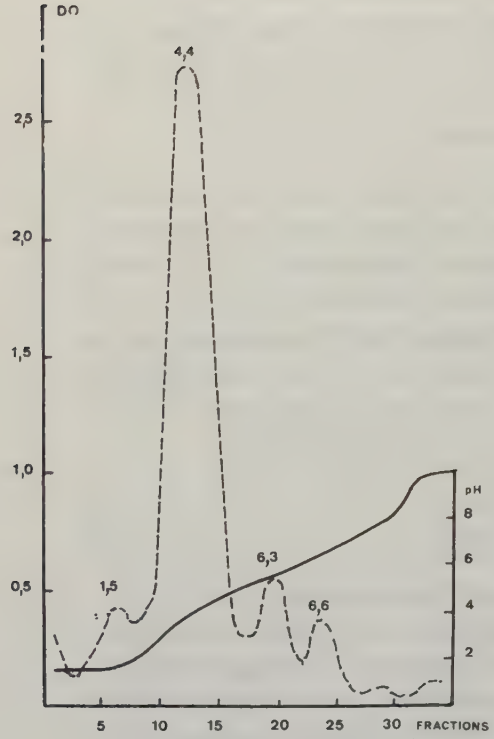


Fig. 48 - Courbe d'électrofocalisation de la β-lipoprotéine humaine.

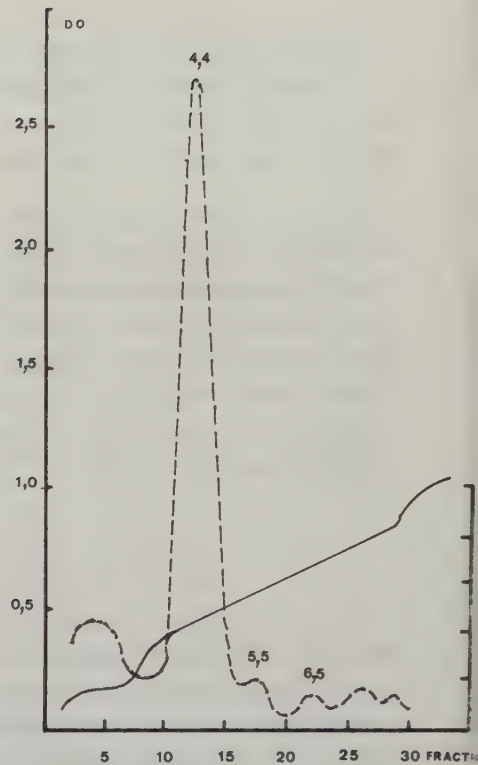


Fig. 49 - Courbe d'électrofocalisation de la β-lipoprotéine humaine soumise à l'incubation pendant 72 heures.

1 : témoin

2 : incubation

3 : incubation en présence de saponoside

Fig. 50 - Diagrammes électrophorétiques d'une β-lipoprotéine (témoin), d'une lipoprotéine incubée en l'absence ou en présence de saponoside.

2°- Discussion.

Comment interpréter à présent toutes ces constatations?

Comme nous l'avons signalé au début, deux groupes de travaux méritent d'être rapprochés de nos observations, tout d'abord ceux de Nichols, Coggiola, Jensen et Yokoyama (191), puis ceux de Tayeau, Tixier, Rebeyrotte et Ballivian (305) . Les premiers auteurs ont signalé, en 1968, qu'au cours de l'incubation du plasma, il se produit, sous l'influence de la LCAT, un certain nombre de modifications signalées plus haut . Ces modifications sont inhibées par le p-hydroxy-mercuri-benzoate de sodium . Mais, à côté de ces modifications, il s'en produit d'autres absolument insensibles à cet inhibiteur, parmi lesquelles un passage des résidus lipo-apoprotéiques de HDL 3 sur HDL 2 . Les seconds auteurs (voir 298) ont noté, en 1964, qu'un sérum délipidé, soumis à l'incubation présentait un diagramme électrophorétique en veine liquide différent de celui du sérum délipidé non incubé : les β-globulines migraient plus loin et cela quelle que soit la technique de délipidation utilisée (alcool-éther, acétone-éther, méthylal-méthanol , à basse température) . Ce dernier phénomène se montrait alors totalement insensible à l'action des saponosides, inhibiteurs de l'estérification du cholestérol (Tayeau et Nivet (299)) . Il est bien difficile de dire s'il existe un rapport entre le phénomène de Nichols et coll. et celui décrit par Tayeau et coll., mais il est un fait qui ressort de ces expériences : au cours de l'incubation, il se produit d' autres phénomènes que ceux dûs à l'action de la LCAT .

Peut-on penser alors que les observations que nous avons faites présentent un rapport avec celles décrites par les auteurs précités ? Cela est peu probable, car le phénomène que nous avons signalé, à savoir la modification de la migration électrophorétique de la β-lipoprotéine au cours de l'incubation, est inhibé par le p-hydroxy-mercuribenzoate de sodium, alors que ceux décrits par Nichols et par Tayeau se montrent absolument insensibles, le premier au même inhibiteur, le second aux saponosides .

On peut encore se demander, au cas où l'on envisagerait la présence dans la fraction de traces d'HDL et de LCAT, s'il est plausible de mettre en parallèle l'action du p-hydroxy-mercuri-benzoate de sodium et celle des saponosides . Nous pensons pour notre part

que le premier de ces inhibiteurs intervient surtout sur l'un des sites actifs de l'enzyme et probablement sur le groupement -SH ; il en serait de même pour le monobromacétate de sodium, qui intervient d'une façon identique . Le second inhibiteur doit intervenir d'une manière très différente et il nous paraît plausible de penser que, par une réaction du type icélomorphe, il forme, comme les sels biliaires d'ailleurs, un complexe avec le cholestérol, empêchant ainsi son estérification . Il existe donc là deux mécanismes différents, qui rendent difficile la comparaison .

Pour essayer de justifier ce point de vue , nous avons effectué une dernière expérience consistant à étudier le comportement électrophorétique d'une β-lipoprotéine pure à l'incubation en présence de saponoside du Sapindus mukorosi (1 p.100) .

Notre essai a montré que ce saponoside, qui empêche l'estérification du cholestérol et ainsi les modifications du lipoprotéinogramme (299) au cours de l'incubation, se montre sans effet sur la migration électrophorétique en agarose de la lipoprotéine incubée, ainsi qu'il ressort des diagrammes de la figure 50 .

Il existe donc bien une différence d'action entre le p-hydroxy-mercuri-benzoate de sodium et les saponosides .

Peut-on aller jusqu'à penser, si l'on admet toujours la présence dans le milieu de traces éventuelles d'HDL et de LCAT que, ainsi qu'on l'a suggéré (123) , la LCAT ne soit peut-être pas une transférase et qu'il y ait deux phénomènes différents, l'hydrolyse des lécithines et l'estérification du cholestérol ? Dans ce cas, on comprendrait que le p-hydroxy-mercuri-benzoate de sodium empêche l'hydrolyse de la lécithine et ne libère pas les acides gras dont la présence, si l'on en croit les explications fournies (290), justifient la migration plus avancée de la fraction ; on comprendrait également que le saponoside, qui n'intervient que sur l'estérification du cholestérol, n'empêche pas l'hydrolyse des lécithines. Cette explication n'est pas non plus satisfaisante , car les saponosides, comme nous l'avons signalé plus haut, empêchent les modifications électrophorétiques dues à la LCAT (299) .

Nous estimons, pour notre part, que l'explication est toute autre . Rien n'est plus fragile que les lipoprotéines sériques : la simple dialyse ne modifie-t-elle pas leurs propriétés (Rebeyrotte (213)) ? Or, pour étudier les fractions lipidoprotéidiques au cours

de l'incubation , Nichols et coll. ont réalisé des séparations de fractions et ont mis en œuvre des réactifs divers, exerçant peut-être une action sur la structure des particules ; pour étudier l'incubation des fractions délipidées, Tayeau et coll. ont utilisé des solvants qui, comme l'alcool ou le méthylal, même à basse température, modifient considérablement les propriétés des protéines constitutives ; enfin nous-même , en préparant la β-lipoprotéine, avons aussi traumatisé cette fraction, et la preuve en est fournie par l'augmentation sensible de la viscosité de la solution au cours de l'incubation à 37° C, alors que rien de semblable ne se produit avec un sérum .

Nous pensons donc que les "traumatismes" subis par les fractions, au cours de leur préparation ou de leur traitement, ont fait apparaître des propriétés, qui étaient primitivement masquées, en raison de la structure complexe de ces substances . Les observations que nous avons faites n'ont donc probablement aucun rapport avec la LCAT , mais constituent un phénomène qui mérite d' être étudié .

Conclusions du Chapitre II

Dans ce chapitre, nous avons exposé les travaux sur la synthèse in vitro d'associations lipides-protéines . Nous avons ensuite fait le point de nos connaissances d'abord sur la biosynthèse, ensuite sur le catabolisme des diverses lipoprotéines .

Nous avons réalisé deux séries de recherches personnelles . Dans la première série, nous avons étudié le comportement des complexes β-lipoprotéines-oléate de sodium . Nous avons confirmé d'abord les travaux antérieurs montrant que l'addition d'oléate à une protéine augmentait son déplacement électrophorétique , mais nous avons démontré également, grâce à diverses techniques (immunoélectrophorèse mono et bi-dimensionnelle, utilisation d'éléments radioactifs, électrofocalisation), que, si le complexe formé était soumis à l'incubation, le déplacement électrophorétique devenait voisin de celui du témoin . Nous avons interprété cette constatation, que nous avons étendue à la biosynthèse des lipoprotéines .

Dans la seconde série, nous avons étudié à l'aide de diverses techniques le comportement d'une β-lipoprotéine pure à l'incubation . Les résultats que nous avons obtenus mettent en évidence le fait qu'au cours de l'incubation d'un sérum , il se produit probablement d'autres phénomènes que ceux concernant la LCAT .

CONCLUSIONS GENERALES

Notre travail a pour but d'apporter une contribution à l'étude de la structure et du métabolisme des lipoprotéines du sérum sanguin .

Dans le premier chapitre, consacré principalement aux problèmes de structure, nous rappelons brièvement les anciennes recherches concernant le fractionnement des protéines . Nous évoquons ensuite les travaux de Machebœuf et de ses élèves et la mise en évidence des associations lipido-protéidiques (cénapses) . Nous analysons les recherches effectuées entre 1929 et 1945 sur les modes de liaison entre lipides et protéines et nous insistons sur certaines recherches qui ont conduit à des hypothèses laissant soupçonner l'existence de phénomènes découverts plus tard .

Nous traitons ensuite le fractionnement des lipoprotéines par électrophorèse et par ultracentrifugation et nous décrivons les caractéristiques et les propriétés des principales lipoprotéines. Nous passons en revue les diverses apoprotéines constitutives .. Nous analysons enfin les récentes recherches, fondées sur des mesures physiques et biochimiques et sur des modèles artificiels mettant en jeu les ordinateurs, ayant permis de concevoir la structure des diverses lipoprotéines sériques .

Nous exposons alors nos recherches personnelles, qui portent principalement sur les places respectives occupées par le cholestérol libre et le cholestérol estérifié au sein de la particule de β-lipoprotéine . Pour cela, nous faisons appel aux techniques de Machebœuf et Tayeau, concernant l'extraction des lipides sériques

par l'éther, en présence de détergents, en l'occurence l'oléate de sodium et les saponosides . Ces auteurs ont en effet, montré que cette extraction atteint un maximum pour une certaine concentration en détergent : en deça de cette concentration, l'extraction du cholestérol total augmente en proportion de la quantité de détergent mise en jeu . On pourrait penser que les deux formes de cholestérol, libre et estérifié, suivent l'extraction du cholestérol total . Les expériences effectuées avec une β-lipoprotéine (principal constituant des LDL) purifiée et testée par différentes techniques ont montré qu'il n'en est rien et que le cholestérol estérifié est d'abord extrait préférentiellement au cholestérol libre et que le maximum d'extraction du cholestérol estérifié s'effectuait pour une concentration en détergent très inférieure à celle permettant le maximum d'extraction du cholestérol total . Nous en concluons que le cholestérol estérifié, contrairement à diverses hypothèses (Pollard, Badin), occupe dans la particule une position plus superficielle que le cholestérol libre . Nos résultats viennent apporter une confirmation aux observations de Mateu et coll., qui ont justement montré, à l'aide de techniques physiques, et en particulier par la diffusion centrale de rayons X et par la microscopie électronique, que le cholestérol estérifié occupait une position superficielle,tandis que le cholestérol libre se trouvait à l'intérieur de la particule .

Dans le second chapitre, consacré au métabolisme des lipoprotéines sériques, nous rappelons tout d'abord les tentatives de synthèse in vivo des associations lipido-protéidiques . Nous faisons ensuite le point de nos connaissances sur la biosynthèse,puis sur le catabolisme des diverses lipoprotéines, en réservant une place particulière aux enzymes, qui entrent en jeu . Nous évoquons enfin la complexité du problème .

Nous exposons alors nos recherches personnelles,d'abord sur les complexes β-lipoprotéines-acides gras, ensuite sur le comportement d'une β-lipoprotéine à l'incubation .

Nous avons préparé un complexe entre une β-lipoprotéine humaine purifiée et l'oléate de sodium . Utilisant diverses techniques (immunoélectrophorèse mono et bi-dimensionnelle,mise en

jeu d'isotopes radioactifs, électrofocalisation), nous confirmons d'abord les résultats antérieurs, selon lesquels le complexe formé migre plus loin à l'électrophorèse que la β-lipoprotéine pure . Mais nous prouvons ensuite que, si un tel complexe est préalablement soumis à l'incubation à 37° C pendant 72 heures, il n'en est plus du tout de même : le complexe se conduit à l'électrophorèse comme la β-lipoprotéine pure . Le complexe formé présente des propriétés identiques à celles des complexes naturels . Cette constatation nous permet d'émettre des hypothèses sur les "remanie - ments" au sein de la molécule au cours de l'incubation et d'appliquer nos conceptions à la biosynthèse de certaines lipoprotéines .

Nous avons enfin étudié le comportement d'une β-lipoprotéine humaine purifiée et testée à l'incubation à 37°C . Nous avons noté, comme nous nous y attendions d'ailleurs, qu'il ne se produisait aucune estérification du cholestérol : on sait, en effet, que la lécithine : cholestérol-acyl-transférase, qui agit au cours de l'incubation , se trouve dans les α-lipoprotéines et que son substrat est constitué par les HDL, alors que la β-lipoprotéine appartient aux LDL . Mais nous avons constaté qu'il se produit, au cours de l'incubation, une modification électrophorétique, alors que normalement les deux phénomènes (estérification du cholestérol et modification électrophorétique) sont liés : la β-lipoprotéine incubée migre plus loin que le témoin non incubé ! Or cette migration se trouve inhibée par le p-hydroxy-mercuri-benzoate de sodium, par le N-éthyl-maleimide et par l'acide 5,5'di-thio-bis-2-nitrobenzoïque, inhibiteurs habituels de la LCAT . Nous avons comparé nos observations avec celles de Nichols et coll. et Tayeau et coll. , ayant montré qu'au cours de l'incubation, il se produisait d' autres phénomènes que ceux intéressant la LCAT . A la faveur de ces observations, nous avons étudié l'effet exercé sur le phénomène par les saponosides, autres inhibiteurs de l'estérification du cholestérol, qui contrairement aux précédents, se montrent sans action sur le phénomène . Nous discutons nos résultats et nous concluons qu'au cours de l'incubation du sérum, d'autres phénomènes que ceux intéressant la LCAT se produisent . Cette conclusion ouvre la voie à de prochaines recherches .

BIBLIOGRAPHIE

---

1. AGOSTINI B., SEIDEL D. et WIELAND H.- Electron microscopy of low-density plasma lipoproteins in patients with type II-a hyperlipoproteinemia. *Naturwiss.*, 1973, 60, 1-3.

2. AHRENS E.H. Jr et KUNKEL H.G.- The stabilization of serum lipids emulsions by serum phospholipids. *J. exp. Med.*, 1949, 90, 409-424.

3. AKANUMA Y. et GLOMSET J.- In vitro incorporation of cholesterol ^{14}C into very low density lipoprotein cholesteryl esters. *J. Lipid. Res.*, 1968, 9, 620-626.

4. ALAUPOVIC P., KOSTNER G., LEE D.M., Mc CONATHY W.J. et MAGNANI H.N.- Peptide composition of human plasma apolipoproteins A, B and C. *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1972, 31, 145-160.

5. ALAUPOVIC P.D., LEE D. M. et Mc CONATHY W.J.- Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 260, 689-707.

6. ALBERS J.J., CABANA V.G. et STAHL D.B.- Purification and characterisation of human plasma lecithin cholesterol acyl transferase. *Biochem.*, 1976, 15, 1084-1096.

7. ALCINDOR L.G., INFANTE R., SOLER-ARGILAGA C., RAISONNIER A. et POLONOVSKI J.- Induction of the hepatic synthesis of β-lipoproteins by high concentrations of fatty acids. Effect of actinomycin D. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 210, 483-486.

8. ALVAREZ C. et NEUSCHLOSZ S.M.- The blood cholesterol in arterial hypertension. *Klin. Wochschr.*, 1931, 10, 244-247.

9. ANDREWS A.L., ATKINSON D., BARRATT M.D., FINER E.G., HAUSER H., HENRY R., LESUE R.B., OWENS N.L., PHILLIPS M.C. et ROBERTSON R.N.- Interaction of apoprotein from porcine high density lipoprotein with dimyristoyl lecithin. 2. Nature of lipid protein interaction. *Eur. J. Biochem.*, 1976, 64, 549-563.

10. ASSMANN G. et BREWER H.B. Jr.- A molecular model of high density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 1974, 71, 1534-1538.

11. ASSMANN G., FREDRICKSON D., HERBERT P., FORTE T. et HEINEN R.- An A-II lipoprotein particle in Tangier disease. *Circulation*, 1974, 49, 50. Suppl. III ; abstr., 1974, 1000.

12. ASSMANN G., HIGHET J., SOKOLOSKI E.A. et BREWER H.B. Jr.- ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy of native and recombined lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 1974, 71, 3701-3705.

13. ASSMANN G., SOKOLOSKI E.A. et BREWER H.B. Jr.- ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy of native and recombined lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 1974, 71, 549-553.

14. ATKINSON D., SMITH H.M., DICKSON J. et AUSTIN P.- Interaction of apoprotein from Porcine high density lipoprotein with dimyristoyl lecithin. I - The structure of complexes. *Eur. J. Biochem.*, 1976, 64, 541-547.

15. AUBERTIN J., JENSEN R., BLANQUET P. et TAYEAU F.- Clarification d'une suspension de cholestérol par le sérum sanguin. II - Comportement du cholesterol fixé aux protéines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, 47, 81-92.

16. AVIGAN J.- A method for incorporating cholesterol and other lipids into serum lipoproteins in vitro. *J. biol. Chem.*, 1959, 234, 787-790.

17. AYRAULT-JARRIER M.- Action des détergents sur une β-lipoproteine isolée du sérum humain. Th. Sc., Paris, 1959.

18. AYRAULT-JARRIER M.- Action des détergents sur une β-lipoproteine humaine isolée : étude de l'extractibilité des lipides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1961, 43, 153-165.

19. AYRAULT-JARRIER M., CHEFTEL R. et POLONOVSKI J.- Les glucides de la β-lipoprotéine S_f. 1,063 0-12 du sérum sanguin humain. *Bull. Soc. chim. biol.*, 1961, 43, 811-816.

20. AYRAULT-JARRIER M., MARTINET F. et POLONOVSKI J.- Action des détergents sur une α-lipoprotéine sérique humaine. II - Etude de l'extractibilité des lipides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1963, 45, 369-376.

21. BADIN J. et DENNE M.A.- L'inhibition non spécifique de la streptolysine O et le cholestérol de la β-lipoprotéine dans les maladies dues au streptocoque hémolytique. *Path. Biol.*, 1971, 19, 1081-1088.

22. BADIN J. et DENNE M.A.- Etude de la structure de la β-lipoprotéine avec la digitonine et la streptolysine O, utilisées comme marqueurs spécifiques du cholestérol libre. *Ann. Biol. clin.*, 1973, 31, 71-72.

23. BAKER H.N., DELAHUNTY T., GOTTO A.M. Jr et JACKSON R.L.- The primary structure of high density apolipoprotein - Glutamine I. *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 1974, 71, 3631-3634.

24. BAKER H.N., GOTTO A.M. Jr, et JACKSON R.L.- The primary structure of human plasma high density apolipoprotein glutamine I (Apo A I). II - The aminoacid sequence and alignment of cyanogen bromide fragments IV, III and I. *J. biol. Chem.*, 1975, 250, 2725-2738.

25. BAKER H.N., JACKSON R.L. et GOTTO A.M. Jr.- Isolation and characterization of the cyanogen bromide fragments from the high density apolipoprotein - glutamine I. *Biochem.*, 1973, 12, 3866-3871.

26. BALLIVIAN-ROSADO L.- Etude électrophorétique en veine liquide des sérums soumis à l'incubation. Th. d'Assistant étranger, Drouillard édit., Bordeaux, 1964.

27. BERGMAN E.N., HAVEL R.J., WOLFE B.M. et BOHMER T.- Quantitative studies of the metabolism of chylomicron triglycerides and cholesterol by liver and extrahepatic tissues of sheep and dogs. *J. Clin. Invest.*, 1971, 50, 1831-1839.

28. BIEDERMANN W.- Uber wesen und bedentung der protoplasma lipoïde. *Pflüg. Archiv.*, 1924, 202, 213 ; d'après (170).

29. BIERMAN E.L., STEIN O. et STEIN Y.- Lipoprotein uptake and metabolism by rat aortic smoth muscle cells in tissue culture. *Circulation Res.*, 1974, 35, 136-150.

30. BILHEIMER D.W., EISENBERG S. et LEVY R.I.- The metabolism of very low density lipoprotein proteins- I - Preliminary in vitro and in vivo observations. *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 260, 212-221.

31. BISERTE G. et FRUCHART J.C.- Métabolisme des lipoprotéines. *Ann. Biol. clin.*, 1973, 31, 119-122.

32. BISERTE G., TAYEAU F., MONTREUIL J., HOLLEMAN J. et DAUTREVAUX J.- Etude chimique de la mucoprotéine responsable du phénomène d'obstacle de Donaggio. *Clin. Chim. Acta*, 1956, 1, 115-121.

33. BIZZI A. et MARSH J.B.- Further observations on the attachment of carbohydrate to lipoproteins by rat liver Golgi membranes. *Proc. Soc. expt. Biol. Res.*, 1973, 144, 762-765.

34. BLIX G., TISELIUS A. et SVENSSON H.- Lipids and polysaccharides in electrophoretically separated blood serum proteins. *J. biol. Chem.*, 1941, 137, 485-494.

35. BOYD E.M.- The lipid composition of "milky" blood serum. *Trans. roy. soc. Can.*, 1937, 31, 11-16.

36. BREWER H.B. Jr, LUX S.E., RONAN R. et JOHN H.M.- Amino acid sequence of human apo LP Glu II (Apo A II), an apolipoprotein isolated from the high density lipoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 1972, 61, 1304-1308.

37. BRUT N., LOSSOW W.J., et CHAIKOFF J.L.- In vitro esterification of cholesterol by plasma : the effect of evisceration. *J. Lipid. Res.*, 1962, 413-415.

38. BROWN W.V. et BAGINSKY M.L.- Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 46, 375-381.

39. BROWN W., LEVY R. et FREDRICKSON D.- Further separation of the apoproteins of the human plasma very low density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 200, 573-575.

40. BROWN W., LEVY R. et FREDRICKSON D.- Further characterization of apolipoproteins from the human plasma very low density lipoproteins from the human plasma very low density lipoproteins. *J. biol. Chem.*, 1970, 245, 6588-6594.

41. BURCHARDT A.E.- Beiträge zur chemie und physiologie des blutserums. *Arch. exp. path.*, 1883, 16, 322 ; d'après (280).

42. BURSTEIN M.- Sur l'isolement d'une fraction des lipoprotéines sériques après précipitation par l'héparine ou par des héparinoïdes de synthèse. *C.R. Acad. Sc.*, 1956, 243, 527-529.

43. BURSTEIN M.- Précipitation des β-lipoprotéines sériques par l'héparine et les héparinoïdes de synthèse à pH 5. *C.R. Acad. Sc.*, 1957, 245, 586-588.

44. BURSTEIN M.- Précipitation sélective des lipoprotéines sériques de faible densité par l'héparine en présence du chlorure de magnésium et de saccharose. *C.R. Acad. Sc.*, 1962, 255, 605-607.

45. BURSTEIN M. et SAMAILLE J.- Sur la clarification du sérum lipémique par l'héparine in vitro. *C.R. Acad. Sc.*, 1955, 241, 664-665.

46. BURSTEIN M. et SAMAILLE J.- Sur une nouvelle méthode de dosage des β-lipoprotéines du sérum. *Path. Biol.*, 1958, 6, 541-549.

47. BURSTEIN M., SCHOLNICK H.R.- On the precipitation of serum lipoprotein by heparin. *Nouv. Rev. fr. hématol.*, 1974, 14, 131-136.

48. CAMEJO G.- The structure of human high density lipoprotein : a study of the effect of phospholipase A and trypsin on its components and of the behavior of the lipide and protein moities at the air water interphase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 172, 290-300.

49. CAMPBELL W.R. et HANNA M.J.- Sulfites as proteins precipitants. *J. biol. Chem.*, 1937, 119, 9-14.

50. CANALS J. et GIRARD M.L.- Mécanisme de la fixation des polysaccharides sulfatés sur les lipoprotéines : rôle des phospholipides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1968, 50, 1523-1536.

51. CARDELL R.R. Jr., BADENHAUSEN S. et PORTER K.R.- Intestinal triglyceride absorption in the rat. An electron microscopical study. *J. cell. Biol.*, 1967, 34, 123-155.

52. CAZENAVE M.B.- Apports de la mécanique quantique à la biologie moléculaire du cholestérol. Th. méd., Bordeaux, 1969.

53. CHAPMAN D., LESLIE R.B., HIRZ R. et SCANU A.M.- High resolution NMR spectra of high density serum lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 176, 524-536.

54. CHAPMAN M.J., GOLDSTEIN S. et MILLS G.L.- The structural role of surface protein in human serum low density lipoprotein. 19 th Int. Congr. Biochem. Lipids, Paris, 1976, Poster 1 C 4.

55. CHAPMAN M.J., MILLS G.L. et TAYLAUR C.E.- The effect of a lipid rich diet on the properties and composition of lipoprotein particules from the Golgi apparatus of guinea pig liver. *Biochem. J.*, 1973, 131, 177-185.

56. CIACCIO C.- I lipoidi considerati come costituenti esseziali della cellula (istolipoidi). II distribuzione degle esto lipoïdi nei costituente morfologici della cellula. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 1926, 1, 144-147.

57. COHN E.J. et Coll.- Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV : A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, 68, 459-475.

58. DELAGE B.- Les systèmes lipoprotéidiques du sérum sanguin. Th. Sc., Paris, 1939.

59. DELSAL J.L. et MACHEBOEUF M.- Recherches sur les phosphoaminolipides du sérum sanguin. Nature des phospholipides liés aux albumines du sérum de Cheval à l'état de cénapses acido-précipitables. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, 25, 358-363.

60. DENIS P.- Mémoire sur le sang, 1 vol., Baillière édit., Paris, 1859.

61. DERRIEN Y., ROCHE J. et MANDEL P.- Sur le fractionnement des constituants protéiques du sérum. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, 25, 348-349.

62. DERVICHIAN D.G.- Micelles et macromolécules (émulsions, savons et protéines). *J. Chim. phys.*, 1941, 38, 58-77.

63. DERVICHIAN D.G.- Structural aspect of lipoprotein association. *Disc. Faraday Soc.*, 1949, 6, 7-15.

64. DERVICHIAN D.G.- International Colloquium over Biochemische problemen der lipiden, Brussel, 1953, p. 92.

65. DOLPHIN J.P. et RUBINSTEIN D.- The metabolism of very low density lipoproteins and chylomicrons by purified lipoprotein lipase from rat heart and adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 57, 808-814.

66. DOPHEIDE T.A.A. et INGLIS A.S.- The aminoacid sequence of a protein (apovitelline I) from the low density liprotein of emeu egg yolk. *Australian J. Biol. Sc.*, 1974, 27, 15-21.

67. EICHWALD.- Berträge zur chem. d. gewebebild. Substanzen, 1 vol., Berlin, 1873, d'après (280).

68. EISENBERG S., BILHEIMER D.W. et LEVY R.I.- The metabolism of very low density lipoproteins. II - Studies on the transport of apoproteins between plasma lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 280, 94-104.

69. EISENBERG S., BILHEIMER D.W., LEVY R.I. et LINGREN F.T.- On the metabolic conversion of human plasma very low density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 326, 361-377.

70. EISENBERG S. et LEVY R.I.- Lipoprotein metabolism. *Adv. Lipid Res.*, 1975, 13, 1-89.

71. EISENBERG S. et RACHMILEWITZ D.- Metabolism of rat plasma very low density lipoprotein. I - Fate in circulation of the whole lipoprotein. *Biochim, Biophys. Acta*, 1973, 326, 378-390.

72. EISENBERG S. et RACHMILEWITZ D.- Metabolism of rat plasma very low density lipoprotein. II - Fate in circulation of apoprotein subunits. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 326, 391-405.

73. EISENBERG S. et RACHMILEWITZ D.- Interaction of rat plasma very low density lipoprotein with lipoprotein lipase rich (post heparin) plasma. *J. Lipid Res.*, 1975, 16, 341-351.

74. EISENBERG S. et SCHURR D.- Phospholipid removal during degradation of rat plasma very low density lipoprotein in vitro. *J. Lipid Res.*, 1976, 17, 578-587.

75. EISENBERG S., WINDMUELLER H. et LEVY R.I.- Metabolic fate of rat and human lipoprotein apoproteins in the rat. *J. Lipid Res.*, 1973, 14, 446-458.

76. ERLANDSEN A.- Unterchungen über die lecithinartigen substanjen des myocardiums und der guergestreiften muskeln. *Z. physiol. Chem.*, 1907, 51, 71 ; d'après (280).

77. EYLAR E.H.- The biological role of glycoproteins. *J. Theoret. Biol.*, 1966, 10, 89-113.

78. FEINSCHMIDT L.- *Biochem. Z.*, 1912, 38, 244. Cité par TAYEAU F. dans : III rd int. Conf. biochem. Problems Lipids, 1 vol. (Paleis der Academien édit.), Brussels, 1956, 35.

79. FELLIN R., AGOSTINI B., ROST W. et SEIDEL D.- Isolation and analysis of human plasma lipoproteins accumulating post prandial in an intermediate density fraction (d. 1006-1019 g/ml). *Clin. Chim. Acta*, 1974, 54, 325-333.

80. FIDGE N.H. et FOXMAN J.- *In vivo* transformation of rat plasma very low density lipoprotein into higher density lipoproteins. *Australian J. expt. Biol. Med. Sc.*, 1971, 49, 581-593.

81. FIELDING C.J., SHORE V.G. et FIELDING P.E.- A protein cofactor of lecithin : cholesterol-acyl transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1972, 46, 1493-1498.

82. FINEAN J.B.- Phospholipid cholesterol complex in the structure of myelin. *Experientia*, 1953, 9, 16-17.

83. FINER E.G., HENRY R., LESLIE R.B. et ROBERTSON R.N.- NMR studies of pig low and high density serum lipoproteins. Molecular motions and morphology. *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 380, 320-337.

84. FISCHER W.R. et GURIN S.- Structure of lipoproteins : covalently bound fatty acids. *Science*, 1964, 143, 362-363.

85. FLODIN P. et KILLANDER J.- Fractionation of human serum protein by gel filtration. *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 63, 403-410.

86. FLORKIN M. et STOTZ E.H.- Comprehensive biochemistry, 30 vol. Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, London, New-York, 1963. Voir vol. 6 (1965), p. 19.

87. FORBES J.C.- Determination of cholesterol in blood plasma and serum. *J. Lab. clin. Med.*, 1931, 16, 520-522.

88. FORTE G.M., NICHOLS A.V. et GLAESER R.M.- Electron microscopy of human serum lipoproteins using negative staining. *Chem. Phys. Lipids*, 1968, 2, 396-408.

89. FREDRICKSON D.S., ALTROCCHI P.H. et AVIOLI L.V.- Tangier disease. Combined clinical staff conference at the National Institute of Health. *Ann. intern. Med.*, 1961, 55, 1016-1031.

90. FREDRICKSON D.S., MORGANROTH J. et LEVY R.I.- Type III hyperlipoproteinemia an analysis of two comtemporary definitions. *Ann. intern. Med.*, 1975, 82, 150-157.

91. FRIEDMAN H.I. et CARDELL R.R. Jr.- Effects of puromycin on the structure of rat intestinal epithelial cells during rat absorption. *J. Cell. Biol.*, 1972, 52, 15-40.

92. FRNKA J. et REIZER R.- The effect of diet cholesterol on the synthesis of rat serum apolipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 360, 322-338.

93. GANESSAN D. et BASS H.B.- Isolation of C I and C II activated lipoprotein lipases and protamine insensitive triglyceride lipase by heparin sepharose affinity chromatography. *FEBS let.*, 1975, 53, 1-4.

94. GLANGEAUD M.C., PASTIER D., AYRAULT-JARRIER M. et POLONOVSKI J.- Etude de sub-unités des lipoprotéines de haute densité du sérum humain après délipidation partielle. *Biochimie*, 1974, 86, 245-253.

95. GLOMSET J.A.- The plasma lecithin : cholesterol-acyltransferase reaction. *J. Lipid Res.*, 1968, 9, 155-167.

96. GLONEK I., HENDERSON T.O., KRUSKI A.W. et SCANU R.M.- ^{31}P nuclear magnetic resonance : application to the study of human high density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 348, 155-161.

97. GOFMAN J.W., LUNDGREN F.T. et ELLIOTT H.- Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J. biol. Chem.*, 1949, 179, 973-979.

98. GOLDSTEIN J.L. et BROWN S.- Familial hypercholesterolemia. A genetic regulatory defect in cholesterol metabolism. *Am. J. Med.*, 1975, 58, 973-979.

99. GORDON R.S. Jr.- Interaction between oleate and the lipoproteins of human serum. *J. Clin. Invest.*, 1955, 34, 477-484.

100. GORTER E. et HERMANS J.- Surface spreading of Macheboeuf's lipoproteins. *Proc. Nederl. Akad. Wet.*, 1942, 45, 804-807.

101. GOTTO A.M. Jr.- Mechanism of lipid binding by the plasma lipoproteins. 10 th Internationel congress of biochemistry, Hamburg, july 1976, conf. lectures, p. 71.

102. GRETEN H.- Untersuchungem zum stoffwechsel menschlicher Chylomikronen. *Klin. Wochschr.*, 1974, 52, 947-955.

103. GRETEN H.- Enzymatic degradation of plasma lipoproteins. *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1972, 31, 161-181.

104. GUSTAFSON A.- Studies on human serum. Very low density lipoproteins. *Acta Med. Scand.*, 1966, 172, suppt 446, 1 vol., 44 p.

105. GUSTAFSON A., ALAUPOVIC P. et FURMAN R.- Studies on the composition and structure of serum lipoproteins : isolation, purification and characterization of very low density lipoproteins of human serum. *Biochem.*, 1965, 4, 596-605.

106. GUSFAFSON A., ALAUPOVIC P. et FURMAN R.- Studies of the composition and structure of serum lipoproteins. Separation and characterization of Phospholipid-protein residues obtained by partial delipidization of very low density lipoproteins of human serum. *Biochem.*, 1966, 5, 632-640.

107. HADDAM R., HELIO R. et DERVICHIAN D.G.- Analyse par titrimétrie et par microscopie électronique de la structure moléculaire des lipoprotéines après dissection enzymatique. *Biochim.*, 1974, 56, 255-262.

108. HAHN P.F.- Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin. *Science*, 1943, 98, 19-20.

109. HALLIBURTON.- *J. Physiol.*, 1886, 7, 319 ; d'après (280).

110. HAMILTON R.L.- Synthesis and secretion of plasma lipoproteins. *Adv. exptl., Med. Biol.*, 1972, 26, 7-24.

111. HAMILTON R.L., ROGER D.M., GRAY M.E. et LE QUIRE V.S.- Lipid transport in liver. I - Electron microscopic identification of very low density lipoproteins in perfused rat liver. *J. Lab. Invest.*, 1967, 16, 305-319.

112. HARA I., FUKUDA T., SATO J. et MURAMUTSU F.- Immunochemical study on cholesterol in human serum lipoproteins. 19 Int. Congr. Biochem. Lipids, Paris, 1976, poster 1 Cl. Abstracts p. 11.

113. HARRIS R.K.- Nuclear magnetic resonance, vol. 5, 371 p., Chem. Soc., édit., London 1976.

114. HARTLEY G.S., COLLIE B. et SAMIS C.S.- Transport numbers of paraffin chain salts in aqueous solution. I - Measurement of transport numbers of cetylpyridinium and cetyl-trimetyl-ammonium bromides and the interprétation in terms of micelle formation with some data also for cetane sulfuric acid. *Trans. Faraday Soc.*, 1936, 32, 795-815.

115. HATCH F.T., ASO Y., HAGOPIAN L.M. et RUBENSTEIN J.J.- Biosynthesis of lipoprotein by rat intestinal mucosa. *J. biol. Chem.*, 1966, 241, 1655-1665.

116. HATTORI K.- Kolloidstudien über den Ban der roten Blutkörperchen und über Hamolyse. III - Ultramikroskopische Untersuchungen an Lipoiden. *Biochem. Z.*, 1921, 119, 45-55.

117. HAUSER H.- Lipid-protein interaction in porcine high density (HDL3) lipoprotein. *FEBS let.*, 1975, 60, 71-75.

118. HAUSER H., HENRY R., LESLIE R.B. et STUBBS J.M.- The interaction of apoprotein from Porcine high density lipoprotein with dimyristoyl phosphatidyl choline. *Eur. J. Biochem.*, 1974, 48, 583-594.

119. HAVEL R.J., EDER H.A. et BRAGDON J.H.- The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, 1955, 34, 1345-1353.

120. HAVEL R.J., KANE J.P. et KASHYAP M.L.- Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man. *J. Clin. Invest.* 1973, 52, 32-360.

121. HAY R.V., POTTENGER L.A., REINGOLD G., GETZ S. et WISSLER R.W.- Degradation of ^{125}I labelled serum low density lipoprotein in normal and estrogen treated male rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, 44, 1471-1477.

122. HERBERT P., LEVY R.I. et FREDRICKSON D.S.- Conection of COOH-terminal amino acids of human plasma very low density apolipoprotein. *J. biol. Chem.*, 1971, 246, 7068-7069.

123. HOFFMANN-OSTENHOF O.- Remarque à propos de la discussion sur la LCAT au symposium international de biochimie et de nutrition. Ispahan (Iran), 1973.

124. HOFMEISTER Z.- Zur lehre von der wirkung der salze. Dritte Mittheilung, *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1889, 25, 1 ; d'après (280).

125. HOMER A.- Biochem. Zeitschr., 1889, 278, d'après (280).

126. HOPPE-SEYLER F.- *Handbuch der phys. Chem.*, 1870, 3, 196, d'après (170).

127. HOWE.- The use of sodium sulfate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood. *J. biol. Chem.*, 1921, 49, 93 ; d'après (280).

128. INFANTE R.- La biosynthèse des lipoprotéines plasmatiques et sa régulation. *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1972, 31, 55-90.

129. INFANTE R., ALCINDOR G., RAISONNIER A., PETIT D., POLONOVSKI J. et CAROLI J.- Biosynthèse des lipoprotéines plasmatiques par le foie en régénération. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 187, 335-349.

130. INGRAM D.J.E.- Biological and biochemical applications of electron spin resonance. 1 vol., Adam Hilger édit., London 1969.

131. ISSELBACHER K.J. et BUDZ D.M.- Synthesis of lipoproteins by rat intestinal mucosa. *Nature*, 1963, 200, 364-365.

132. JACKSON R.L., GOTTO A.M. Jr., LUX S.E., JOHN K.M. et FLEISCHER S.- Human plasma high density lipoprotein. Interaction of the cyanogen bromide fragments from apolipoprotein glutamine II (A-II) with phosphatidylcholine. *J. biol. Chem.*, 1973, 248, 8449-8456.

133. JACKSON R.L., MAO S.J.T. et GOTTO A.M. Jr.- Effects of maleylation on the lipid binding and immunochemical properties of human plasma high density apolipoprotein A II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 61, 1317-1324.

134. JACKSON R.L., MORRISETT J.D. et GOTTO A.M. Jr.- Lipoprotein structure and metabolism. *Physiol. Rev.*, 1976, 56, 259-316.

135. JACKSON R.L., MORRISETT S.D., GOTTO A.M. Jr. et SEGREST J.P.- The mechanism of lipid binding by plasma lipoproteins. *Mol. Cell. Biochem.*, 1975, 6, 43-50.

136. JACKSON R.L., SPARROW J.T., BAKER H.N., MORRISET J.P., TAUNTON O.D. et GOTTO A.M. Jr.- The primary structure of apolipoprotein serine. *J. biol. Chem.*, 1974, 249, 5308-5313.

137. JAMESON E. et ROBERTS D.B.- A phase-rule study of the proteins of the blood serum : a comparison of the proteins of human, rat and horse serum. *J. gen. Physiol.*, 1937, 20, 475-489.

138. JENSEN R., AUBERTIN J. et TAYEAU F.- Clarification d'une suspension de cholestérol par le sérum sanguin. I - Etude expérimentale. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1965, 47, 69-80.

139. JONAS A.- Location of aromatic amino acid residues in bovine serum high density lipoprotein. *Biochem.*, 1973, 12, 4503-4507.

140. JONES A.L., RUDERMAN N.B. et HERRERA M.G.- Electron microscopic and biochemical study of lipoprotein synthesis in the isolated perfused rat liver. *J. Lipid. Res.*, 1967, 8, 429-446.

141. KALCHEVA D.- Precipitation of the protein of blood serum by copper sulfate. Ann. univ. Sofia II, Faculté, Phys. math., 1934, 30, n° 2, 61-79 ; d'après *Chem. Abstr.*, 1935, 29, 3360.

142. KORN E.D.- Properties of clearing factor obtained from rat heart acetone powder. *Science*, 1954, 120, 399-400.

143. KOSTNER G.- Studies on the cofactor requirement for lecithin : cholesterol-acyl-transferase. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1974, 33, suppl 137, 19-21.

144. KRAUS R.M., LEVY R.I. et FREDRICKSON D.S.- Selective measurement of two lipase activities in post heparine plasma from normal subjects and patients with hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Invest.*, 1974, 54, 1107-1124.

145. KUHNE.- *Lehrb. d. physiol. Chem.*, Liepzig, 1886 p. 175 ; d'après (170).

146. KUNKEL H.G. et SLATER R.J.- Lipoprotein patterns of serum obtained by zone electrophoresis. *J. Clin. Inv.*, 1952, 31, 677-684.

147. LAGGNER R., KRATKY O., KOSTNER G., SATTLER J. et HOLASEK A.- Small angle X-ray scattering of Lp A, the major lipoprotein family of human plasma high density lipoprotein HDL. *FEBS Let.*, 1972, 27, 53-57.

148. LAGGNER P., MULLER K. et KRATKY O.- 3 rd Int. Conf. on X ray and neutron small angle scattering, 1973, Grenoble et LAGGNER P., MULLER K., KRATKY O., KOSTNER G. et HOLASEK A.- Conf. on serum lipoprotein, 1973, Graz ; d'après Mateu L. (182).

149. LAGGNER P., MULLER K., KRATKY O., KOSTNER G. et HOLASEK A.- Studies on the structure of lipoprotein A of human high density lipoprotein HDL3. The spherically averaged electron density distribution. *FEBS Let.*, 1973, 33, 77-80.

150. LANGER R., STROBER W. et LEVY I.- The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Invest.*, 1972, 51, 1528-1536.

151. LAROSA J.C., LEVY R.I., BROWN W.V. et FREDRIKSON D.S.- Changes in high density lipoprotein composition after heparin induced lipolysis. *Am. J. Physiol.*, 1971, 220, 785-791.

152. LAURELL L.B.- Antigen antibody crossed electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 1965, 10, 358-361.

153. LAWFORD G.R. et SCHACHTER H.- Biosynthesis of glycoprotein by liver. *J. biol. Chem.*, 1966, 241, 5408-5418.

154. LEE D. et ALAUPOVIC P.- Studies of the composition and structure of plasma lipoproteins. Isolation composition and immuno chemical characterization of low density lipoprotein subfractions of human plasma. *Biochem.*, 1970, 9, 2244-2252.

155. LE FRON G. et BONNET P.- L'équilibre protéique du sérum sanguin des lépreux. *Bull. Acad. Méd.*, 1934, 111, 175-177.

156. LEHMANN.- *Lehrb. Physiol.*, 1862, 428 ; cité d'après (280).

157. LEVY R.I. et EISENBERG S.- The lipoprotein Apoproteins. Their role in normal lipid transport and dyslipoproteinemia. *Ann. Biol. Clin.*, 1974, 32, 1-8.

158. LEVY R.I., LANGER T., GOTTO A.M. Jr. et FREDRICKSON D.S.- Familial hypobeta lipoproteinemia, a defect in lipoprotein synthesis. *Clin. Res.*, 1970, 18, 539.

159. LEWIS L.A., GREEN A.A. et PAGE I.H.- Ultracentrifuge lipoproteins pattern of normal hypertensive and hypothyroid animals. *Am. J. Physiol.*, 1952, 171, 391-400.

160. LEWITH S.- Zur lehre von der wirkung der Salze. *Arch. exp. Path.*, 1888, 24, 1 ; d'après (280).

161. LO C.H. et MARSH J.B.- The synthesis of plasma lipoproteins. Incorporation of ^{14}C glucosamine by cells and subcellular fractions of rat liver. *J. biol. Chem.*, 1970, 245, 5001-5006.

162. LOEPER M., LEMAIRE A. et LESURE A.- Le pouvoir cholestérolytique du sérum humain normal et pathologique. *C.R. Soc. Biol.*, 1928, 98, 101-103.

163. LONG J.H. et GEPHART F.- Observations on the stability of lecithin. On the behaviour of lecithin with bile salts, and the occurence of lecithin bile. *J. Am. Chem. Soc.*, 1908, 30, 881-895, 1312-1319.

164. LUX S.E., HIRZ R., SHRAGER R.I. et GOTTO A.M.- The influence of lipid on the conformation of human plasma high density apolipoproteins. *J. biol. Chem.*, 1972, 247, 2598-2650.

165. LUX S.E., LEVY R.I., GOTTO A.M. Jr et FREDRICKSON D.S.- Studies on the protein defect in Tangier disease. Isolation and characterization of an abnormal high density. *J. Clin. Invest.*, 1972, 51, 2505-2519.

166. LUZZATI V., TARDIEU A., MATEU L. et STUHRMANN H.B.- Structure of human serum lipoproteins in solution. I - Theory and techniques of an X-ray scattering approach using solvents of veritable density. *J. Mol. Biol.*, 1976, 101, 115-127.

167. MACHEBOEUF M.- Recherches sur les stérols, les lipides et les protéides du sérum et du plasma sanguins. Th. Sc., Paris, 1928.

168. MACHEBOEUF M.- Recherches sur les phospho-aminolipides et les stérides du sérum et du plasma sanguins. I - Entrainement des phosphoaminolipides et des stérides par les diverses fractions au cours du fractionnement des protéides du sérum. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, 11, 268-293.

169. MACHEBOEUF M.- In TULLIS J.L.- Cells and plasma proteins : their state in nature, 1 vol., Acad. Press édit., New York, 1935, p. 358.

170. MACHEBOEUF M.- Etat des lipides dans la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique, 1 vol, Herman édit., Paris 1937.

171. MACHEBŒUF M.- Les cénapses lipidoprotéidiques. *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1945, 5, 71-104.

172. MACHEBŒUF M. et PERRIMOND-TROUCHET R. - Recherches sur le rôle biologique des sels biliaires - 1ère note: influence des sels biliaires sur le passage des acides gras à travers les membranes. *C.R. Soc. Biol.*, 1939, 132, 274-276.

173. MACHEBŒUF M. et PERRIMOND-TROUCHET R. - Recherches sur le rôle physiologique des sels biliaires - 2ème note : synthèse de cénapses lipidoprotéidiques par mélange de protéides et de savons en présence de sels biliaires, puis élimination des sels biliaires par dialyse dans des conditions convenables. *C.R. Soc. Biol.*, 1939, 132, 585-588.

174. MACHEBŒUF M. et REBEYROTTE P. - Studies on lipo-protein cenapses of horse serum. *Disc. Faraday Soc.* , 1949, 6, 62-68.

175. MACHEBŒUF M. et SANDOR G. - Etude de l'extraction des lipides du sérum sanguin par l'éther en présence d'alcool. *C.R. Acad. Sc.*, 1932, 194, 1102-1105.

176. MACHEBŒUF M., TAYEAU F. - Sur l'état des lipides et du cholestérol dans le sérum sanguin. Destruction de certaines cénapses lipidoprotéidiques et libération de leurs substances lipoïdiques par un savon. *C.R. Acad. Sc.*, 1938, 206, 860-862.

177. MACHEBŒUF M. et TAYEAU F. - Nouvelles recherches sur la nature et la stabilité des liaisons unissant les lipides aux protéines dans le sérum sanguin. Libération des lipides de certaines cénapses lipidoprotéidiques par divers savons. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, 23, 31-48.

178. MACHEBŒUF M. et WAHL R. - Recherches biologiques sur la néphrose lipoïdique. 1er mémoire. Etude des globulines et des albumines du sérum sanguin et des lipides qui les accompagnent dans leur précipitation. *Bull.Soc. Chim. biol.*, 1931, 13, 486-503.

179. MAGIS C. - Variation de l'extractibilité des lipides du sérum. Influence de facteurs physiques, chimiques et génétiques. Th. Sc., Paris, 1960.

180. MARCUS E. - Uber in Wasser löliches Serumglobulin. *Z. physiol. Chem.*, 1899, 28, 559 ; d'après (280).

181. MARSH J.B. et BUNGENBERG de JONG J.- Biosynthesis of Ribosomes plasma lipoproteins by rat liver. *J. biol. Chem.*, 1968, 343, 192-199.

182. MATEU L.- Contribution à l'étude des interactions entre lipides et protéines dans quelques systèmes naturels et reconstitués d'intérêt biologique. Th. Sc., Paris VII, 1974.

183. MATEU L., TARDIEU A., LUZZATI V., AGGERBECK I. et SCANU A.M.- On the structure of human serum low density lipoprotein. *J. Mol. Biol.*, 1972, 70, 105-116.

184. MAYER A. et TERROINE E.- Sur les propriétés des précipités d'albumines par l'alcool. Redissolution par l'alcool en présence d'électrolytes. *C.R. Soc. Biol.*, 1907, 62, 317-320.

185. MOORE D.H.- Physical techniques in biological research - 2nd édit., Vol. II, Part B. Physical Chemical Techniques. Academic Press édit., New York, London, 1939.

186. MORA R., REBEYROTTE P. et POLONOVSKI J.- Influence des substances tensioactives sur la mobilité électrophorétique des lipoprotéides plasmatiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, 37, 957-968.

187. MORRISET J.D., DAVID J.S.K., POWNALL H.J. et GOTTO A.M. Jr.- Interaction of an apolipoprotein (Apo LP alanine) with phosphatidyl-choline. *Biochem.*, 1973, 12, 1290-1299.

188. MORRISET J.D., JACKSON R.L. et GOTTO A.M.- Lipoproteins structure and function. *Ann. Rev. Biochem.*, 1975, 44, 183-207.

189. NAGLER F.P.O.- Observations on a reaction between the Pethal toxin of Cl. welchii (A) and human serum. *Brit. J. exp. Pathol.*, 1939, 20, 473-485.

190. NESTEL P.J.- Relationship between plasma triglycerides and removal of chylomicrons. *J. Clin. Invest.*, 1964, 43, 943-949.

191. NICHOLS A.V., COGGIOLA E.L., JENSEN L.C. et YOKOYAMA E.H.- Physical chemical changes in serum lipoproteins during incubation of human serum. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 168, 87-94.

192. NIKKILA E.- Lipid-protein relations in normal and pathological serums and the effect of heparin on serum lipoproteins. *Scand. J. Clin. Lab. Inv.*, 1953, 5, supplt 8, 5-101.

193. NILSSON A. et ZILVERSMIT D.B.- Fate of intravenously administered particulate and lipoprotein cholesterol in the rat. *J. Lipid Res.*, 1972, 13, 32-38.

194. NORMAN R.O.C.- Electron spin resonance, vol. 3, 321 p., Chem. Soc. édit., London, 1976.

195. NORUM K.R. et GJONE E.- Familial plasma lecithin : cholesterol-acyltransferase deficiency. Biochemical study of a new inborn error of metabolism. *Scand. Lab. Clin. Med. Invest.*, 1967, 20, 231-243.

196. OBRECHT R.- Diss., Bern, 1942.

197. ONCLEY J.L., SCATCHARD G. et BROWER A.- Physico-chem. characteristics of certain of the proteins of normal human plasma. *J. Phys. et colloid Chem.*, 1947, 51, 184-198.

198. OPPENHEIMER.- *Verh. d. Berl. Physiol. ges.*, 1902 ; d'après (170).

199. PANUM.- *Wirchow Archiv.*, 1851, 3, 251 ; d'après (170).

200. PEDERSEN K.O.- Ultracentrifugal studies of serum and serum fraction. *J. Phys. coll. Chem.*, 1947, 51, 156-163.

201. PERRIMOND-TROUCHET R.- Recherches sur le rôle physiologique des acides biliaires. Th. doct. Univ. (Pharm.), Bordeaux, 1948.

202. PHILLIPS M.C., FINER E.G. et HAUSER H.- Differences between conformations of lecithin and phosphatidyl ethanolamine polar groups and their effects on interactions of phospholipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 290, 397-402.

203. PHILLIPS M.C., HAUSER H., LESLIE R.B. et OLDANI D.- A comparison of the interfacial interactions of the apoprotein from high density lipoprotein and β-casein with phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 406, 402-414.

204. PICARD J., VEISSIERE D. et AYRAULT-JARRIER M.- Structure des lipoproteines normales et pathologiques. *Ann. Biol. clin.*, 1973, 31, 77-86.

205. PINKUS.- *J. Physiol.*, 1901, 27, 57 : d'après (280).

206. PINON J.C., KANE J.P., HAVEL R.J. et LANDAT P.- Conf. on serum lipoproteins, Gratz, 1973, 1 vol.

207. POIRIER J. et CHEVREAU J. - Feuillets d'histologie humaine, fasc. 4, 65 pages, 1 vol. Maloine édit., Paris 1969.

208. POLLARD H. et DEVI S.K. - Constitution of a three dimensional isodensity map of the low density lipoprotein particule from human serum. *Biochem. Biophys. Res.*, 1971, 44, 593-599.

209. POLLARD H. SCANU A.M. et TAYLOR E.W. - On the geometrical arrangement of the protein subunits of human serum density lipoprotein : evidence for a dodecahedra model. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1959, 64, 304-310.

210. POLONOVSKI J. - Action des amines quaternaires à chaîne grasse sur les protéines, les lipides et les cénapses lipoprotéiques. Th. Sc., Paris, 1950.

211. POLONOVSKI J. - Quelques aspects du métabolisme des lipoprotéines. *Biochim.*, 1976, 58, 971-980.

212. PORGES et NEUBAUER. - *Biohem. Zeitschr.*, 1908, 7, 152. Cité par Tayeau F. in III rd int. conf. biochem. Problems Lipids, 1 vol. (Paleis dei Academien, édit.) Brussels, 1956, 35 ; d'après (280).

213. REBEYROTTE P. - Sur la constitution des cénapses lipidoprotéidiques acido-précipitables. Th. Sc.,Paris,1954.

214. REBEYROTTE P. - Applications de l'électrorhéophorèse à l'étude des cénapses lipoprotéiques acido-précipitables. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, 36, 1617-1621.

215. REBEYROTTE P. et LABBE J.P. - La focalisation ionique en colonne liquide. *Bordeaux Méd.*, 1973, 9, 1297-1307.

216. REBEYROTTE P., LABBE J.P., et KOUTSOUKOS A. - Modifications techniques de la méthode d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle. *Ann. Biol. clin.*, 1970, 28, 153-158.

217. REDGRAVE T.G. - Formation of cholesteryl ester-rich particulate lipid during metabolism of chylomicrons. *J. Clin. Invest.*, 1970, 49, 465-471.

218. REICHL D., SIMONS L.A. et MYANT N.B. - The metabolism of low density lipoprotein in a patient with familial hyperbetalipoproteinemia. *Clin. Sc. Mol. Med.*, 1974, 47, 635-638.

219. RESSLER N. - Two dimensional electrophoresis of protein antigens with an antibody containing buffer. *Clin. Chim. Acta*, 1960, 5, 795-800.

220. ROBINSON D.S.- The function of the plasma triglycerides in fatty acid transport. *Compr. Biochem.*, 1970, 19, 51-116.

221. ROBINSON D.S., HARRIS P.M. et FRENCH J.E.- Changes in the solubility of cholesterol during the interaction of chyle and plasma. *Quart. J. Exp. Physiol.*, 1956, 41, 309-317.

222. RODBELL M. et FREDRICKSON D.S.- Nature of the proteins associated with dog and human chylomicrons. *J. biol. Chem.*, 1959, 234, 562-566.

223. ROHEIM P.S., GIDEZ L.I. et EDER H.A.- Extrahepatic synthesis of lipoproteins of plasma and chyle role of the intestine. *J. Clin. Invest.*, 1966, 45, 297-300.

224. ROHEIM P.S., HAFT D.E., GIDEZ L.I. et WHITE A.- Plasma L.P. metabolism in perfused rat livers. *J. Clin. Invest.*, 1963, 42, 1277-1285.

225. ROHEIM P.S., HIRSCH H., EDELSTEIN D. et RACHMILEWITZ D.- Metabolism of iodinated high density lipoprotein submits in the rat. III - Comparison of the removal rate of different subunits from the circulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 278, 517-529.

226. ROHEIM P.S., RACHMILEWITZ C., STEIN V. et STEIN Y.- Metabolism of iodinated high density lipoproteins in the rat. I - Half-life in the circulation and uptake by organs. *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 248, 315-329.

227. SALMON S., BEUCLER I., AYRAULT-JARRIER M. et POLONOVSKI J.- Etude immunologique des lipoprotéines humaines de basse densité. *Paroi artérielle.*, 1976, 3, 115-125.

228. SANDOR G.- Le problème des protéides. Th. Sc., Paris 1934.

229. SATA T., ESTRICH D.L., WOOD P.D.S. et KINSEL L.W.- Evaluation of gel chromatography for plasma lipoprotein fractionation. *J. Lipid Res.*, 1970, 11, 331-340.

230. SATA T., HAVEL R.J. et JONES A.L.- Characterization of subfractions of triglycerid-rich lipoproteins separated by gel chromatography from blood plasma of normolipemic and hyperlipemic humans. *J. Lipid Res.*, 1972, 13, 757-768.

231. SCANU A.- Binding of human serum high density lipoprotein apoprotein with aqueous dispersion of phospholipids. *J. biol. Chem.*, 1967, 242, 711-719.

232. SCANU A.M.- Structural studies of serum lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 265, 471-508.

233. SCANU A.M., EDELSTEIN C. et AGGERBECK L.- Application of the technique of isoelectric focusing to the study of human serum lipoproteins and their apoproteins. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 1973, 209, 311-327.

234. SCANU A. et GRANDA J.- Effects of ultracentrifugation on the human serum high density 1,063 Lp < 1,21 g/ml lipoprotein. *Biochem.*, 1966, 5, 446-455.

235. SCANU A.M., LEWIS L.A. et BUMFUS F.M.- Separation and characterization on the protein moiety of human α^1-lipoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, 74, 390-397.

236. SCANU A., READER W. et EDELSTEIN C.- Molecular weight and subunit structure of human serum high density lipoprotein after chemical modification by succinic anhydride. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 160, 32-45.

237. SCANU A.M. et SCHIANO S.- Su di una nuova metodica di estrazione continua a freddo con etere dei lipidi siero. Applicazione allo studio dei complessi lipoproteici. *Riv. Ist. Sieroter. Ital.*, 1954, 29, 276-302.

238. SCANU A.M. et TARDIEU A.- Temperature transitions of lipid mixtures containing cholesterol esters. Relevance to the structural problem of serum high density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 231, 170-174.

239. SCANU A., JOTH J., EDELSTEIN C., KOGA S. et STILLER E.- Fractionation of human serum high density lipoprotein in urea solutions. Evidence for polypeptide heterogeneity. *Biochem.*, 1969, 8, 3309-3316.

240. SCANU A.M. et WISDOM G.- Serum lipoprotein structure and fruction. *Ann. Rev. Biochem.*, 1972, 41, 703-730.

241. SCHEIDEGGER J.J.- Une microméthode de l'immunoélectrophorèse. *Intern. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 1955, 7, 103-109.

242. SCHMIDT V.- Weiteres über den Faserstoff und die Ursachen semer Gerunnung. *Arch. Anat. Physiol.*, 1862, 48, 428 ; d'après (280).

243. SCHNEIDER H., MORROD R.S., COLVIN J.R. et TATTRIE N.H.- The lipid core model of lipoproteins. *Chem. Phys. Lipids*, 1973, 10, 328-353.

244. SCHONFELD G., BIRGE C., MILLER J.P., KESSLER G. et SANTIAGO J.- Apolipoprotein B levels and altered lipoprotein composition in diabetes. *Diabetes*, 1974, 23, 827-834.

245. SCHULTZ J.S., SHREFFLER D.S. et HARVIE N.R.- Genetic and antigenic studies and partial purification of human serum lipoprotein carrying the Lp antigenic determinant. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1958, 61, 963-970.

246. SCHUMAKER V.N. et ADAMS G.H.- Circulating lipoproteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 1969, 38, 113-136.

247. SCOW R.O., HAMOSH M., BLANCHETTE-MACKIE E.J. et EVANS A.J.- Uptake of blood triglyceride by various tissues. *Lipids*, 1972, 7, 497-505.

248. SEGREST J.P., JACKSON R.L., MORRISETT J.D. et GOTTO A.M. Jr.A molecular theory of lipid protein interaction in the plasma lipoproteins. *FEBS Let.*, 1974, 38, 247-253.

249. SHIPLEY G.G., ATKINSON D. et SCANU A.M.- Small angle X-ray scattering of human serum high density lipoproteins. *J. Supramol. Struct.*, 1972, 1, 98-104.

250. SHORE B. et SHORE V.- Heterogeneity in protein subunits of human serum high density lipoproteins. *Biochem.*, 1968, 7, 2773-2777.

251. SHORE B. et SHORE V.- Some physical chemical studies on two polypeptide components lipoproteins of human serum. *Biochem.*, 1968, 7, 3396-3403.

252. SHORE B. et SHORE V.- Isolation and characterization of polypeptides of human serum lipoproteins. *Biochem.*, 1969, 8, 4510-4516.

253. SHORE B. et SHORE V.- Structure of normal and pathological lipoproteins. *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1973, 31, 3-12.

254. SHORE V.G. et SHORE B.- Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochem.*, 1973, 12, 502-507.

255. SHULMAN R.S., HERBERT P.N., WEHRLY K. et FREDRIKSON D.S.- The complete aminoacid sequence of C-I (apo-LP-Ser), an apolipoprotein from human very low density lipoproteins. *J. biol. Chem.*, 1975, 250, 182-190.

256. SHULMAN R.S., HERBERT P.N., WITTERS L.A., QUICKER T., WEHRLY K.A., FREDRIKSON D.S. et LEVY R.I.- *Fed. Proc.*, 1973, 32, 548-565.

257. SIMMONDS W.J.- Fat absorption and chylomicron formation ; in NELSON G.J.- Blood lipids and lipoprotein, 1 vol, Wiley édit., New York, 1972.

258. SIMONS L.A., REICHE D., MYANT N.B. et MANCINI M.- The metabolism of the apoprotein of plasma low density lipoprotein in familial hyperbetalipoproteinaemia in the homozygous form. *Atheroscl.*, 1975, 21, 283-298.

259. SMELLIE R.M.S.- Plasma lipoproteins. 1 vol., Academic Press édit., New York, 1971.

260. SNIDERMAN A.D., CAREW T.E., CHANDLER J.G. et STEINBERG D.- Paradoxical increase in rate of catabolism of low density lipoproteins after hepatectomy. *Science*, 1974, 183, 526-528.

261. SÖRENSEN S.P.L.- The constitution of soluble proteins as reversible, dissociable component systems. Kolloid. Z., 1930, 53, 306-318.

262. SOUTER A., GARNER C., BAKER H.N., SPARROW J.T., JACKSON R.L. et GOTTO A.M.- The effects of plasma apolipoproteins on lecithin : cholesterol acyl transferase. *Biochem.*, 1975, 14, 3057-3064.

263. SPARROW J.T., GOTTO A.M. Jr et MORRISETT J.D.- *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.*, 1973, 70, 2124-2128.

264. SPARROW J.T., MORRISETT J.D., POWNALE H.J., JACKSON R.L. et GOTTO A.M. Jr.- The mechanism of lipid binding by the plasma lipoproteins : synthesis of model peptides. Proc. 4 th American peptide symposium, 1 vol. Ann. Arbor Science edit., *Ann. Arbor*, 1975, 4, 597-602.

265. SPERRY W.M.- Cholesterolesterase in blood. *J. biol. Chem.*, 1935, 111, 467-478.

266. STARKE K.V.- *Maly's Jahresb*, 1881, 11, 17 ; d'après (280).

267. STEIM J.M., EDNER O.J. et BARGOOT F.G.- Structure of human serum lipoproteins : nuclear magnetic resonance supports a micellar model. *Science*, 1968, 162, 909-914.

268. STEIN O. et STEIN Y.- Fine structure of the ethanol induced fatty liver in the rat. *Israël J. Med. Sc.*, 1965, 1, 378-388.

269. STEIN O. et STEIN Y.- The role of the liver in the metabolism of chylomicrons, studied by electron microscopic autoradiography. *Lab. Invest.*, 1967, 17, 436-446.

270. STEIN O. et STEIN Y.- Lipid synthesis, intracellular transport, storage and secretion. *J. Cell. Biol.*, 1967, 33, 319-339.

271. STEIN O. et STEIN Y.- Colchicine induced inhibition of very low density lipoprotein release by rat liver in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 142-147.

272. STEIN O., STEIN Y., GOODMAN D.S. et FIDGE N.H.- The metabolism of chylomicron cholesteryl ester in rat liver. *J. Cell. Biol.*, 1969, 43, 410-431.

273. STOFFEL W., ZIERERBERG O., TUNGGAL B.D. et SCHREIBER E.- ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopic evidence for hydrophobic lipid protein interactions in human high density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.*, 1974, 71, 3696-3700.

274. STOFFEL W., ZIERERBERG O., TUNGGAL B.D. et SCHREIBER E.- ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy studies on lipid protein interactions in human high density lipoproteins (HDL). *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1974, 355, 1381-1390.

275. SWELL L. et TREADWELL C.R.- Cholesterol esterase - III Occurence and characteristics of cholesterol esterase of serum. *J. biol. Chem.*, 1950, 185, 349-395.

276. TARDIEU A., MATEU L., SARDET C., WEISS B., LUZZATI V., AGGERBECK L. et SCANU A.M.- Structure of human serum lipoproteins in solution. II - Small-angle X-ray scattering study of HDL3 et LDL. *J. Mol. Biol.*, 1976, 101, 129-153.

277. TAYEAU F.- Recherches sur la nature, la stabilité et le rôle biologique des liaisons unissant les lipides et les protéides dans le sérum sanguin. Thèse Sc., Bordeaux 1939.

278. TAYEAU F.- Recherches sur le vieillissement du sérum sanguin. Stabilité des lipides sériques en fonction de la conservation aseptique du sérum. *C.R. Soc. Biol.*, 1939, 130, 1027-1029.

279. TAYEAU F.- Sur l'état du cholestérol dans le sérum sanguin. Destruction des cénapses cholestéroprotéidiques par les saponosides. *C.R. Acad. Sc.*, 1941, 212, 575-577.

280. TAYEAU F.- Protéides et lipides dans le sérum sanguin. Th. Méd., Bordeaux, 1944.

281. TAYEAU F.- Nouvelles recherches sur le vieillissement du sérum sanguin. Stabilité des cénapses cholestéroprotéidique en fonction de la conservation aseptique du sérum. *C.R. Soc. Biol.*, 1944, 138, 423-424.

282. TAYEAU F.- Sur la nature des liaisons unissant les lipides et les protéides dans les cénapses acido-précipitables du sérum sanguin. *C.R. Soc. Biol.*, 1944, 138, 700-702.

283. TAYEAU F.- Nouvelles recherches sur la nature des liaisons unissant les lipides aux protéides dans le sérum sanguin. Action des saponosides et de l'éther sur le sérum. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1944, 26, 287-293.

284. TAYEAU F.- Le vieillissement du sérum sanguin. Modification de son système lipidoprotéidique. *Bull. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1945, 83, 62-73.

285. TAYEAU F.- A propos du dosage du cholestérol sérique par les saponosides. *Ann. Biol. clin.*, 1950, 8, 602-603.

286. TAYEAU F.- Sur le "décollement" du cholestérol sérique par certains saponosides. *Méd. Trop.*, 1950, 10, 841-845.

287. TAYEAU F.- Les lipoprotéines et les glucoprotéines plasmatiques. IIe Congrès Nat. Transfusion sanguine, Bordeaux, 1958, Delmas édit. Vol. congrès, p. 268-289.

288. TAYEAU F.- Le facteur clarifiant. *Biochim. Appl.*, 1965, 12, 92-100.

289. TAYEAU F.- Facteur clarifiant et athéromatose. *Rev. méd. Limoges*, 1971, 2, 59-63.

290. TAYEAU F.- La lécithine:cholestérol-acyl-transférase. *Ouest méd.*, 1974, 27, 1373-1376.

291. TAYEAU F., BISERTE G., MONTREUIL J. et MARQUEVIELLE S.- Identification de la substance responsable du phénomène d'obstacle de Donaggio. *C.R. Acad. Sc.*, 1953, 237, 208-209.

292. TAYEAU F. et DUMON M.F.- Travail inédit.

293. TAYEAU F., JENSEN R. et AUBERTIN J.- Le facteur clarifiant. *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1965, 26, 177-213.

294. TAYEAU F., JOUZIER E. et TIXIER M.- Sur l'inhibiteur naturel du facteur clarifiant. *Bull. Acad. Méd.*, 1967, 151, 521-524.

295. TAYEAU F., JOUZIER E. et TIXIER M.- Recherches sur les hyperlipémies expérimentales. II - Isolement et étude *in vitro* d'un inhibiteur naturel du facteur clarifiant. *Bordeaux méd.*, 1970, 3, 2011-2014.

296. TAYEAU F., JOUZIER E. et TIXIER M.- Recherches sur les hyperlipémies expérimentales. III - Action *in vivo* de l'inhibiteur du facteur clarifiant. *Bordeaux méd.*, 1970, 3, 2017-2020.

297. TAYEAU F. et MARTIN M.- Sur la séparation des diverses fractions protéidiques du sérum sanguin. *C.R. Soc. Biol.*, 1943, 137, 503-504.

298. TAYEAU F. et NIVET R.- Estérification du cholestérol sérique et associations lipido-protéidiques. *C.R. Acad. Sc.*, 1955, 240, 567-569.

299. TAYEAU F. et NIVET R.- Un nouvel inhibiteur de l'estérification du cholestérol sérique : les saponosides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, 37, 635-642.

300. TAYEAU F. et NIVET R.- Protéines et sérums latescents. III° congreso de la Sociedad internacional para el estudio de las grasas, Seville, 1958. Vol. congrès p. 24.

301. TAYEAU F., NIVET R., MARQUEVIELLE J. et DUMAS M.- Action du leucocyanidol sur le sérum sanguin "in vitro". *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1958, 40, 671-682.

302. TAYEAU F., NIVET R., NEUZIL E. et GROUILLE J.- Le phénomène d'obstacle de Donaggio. Recherches physio-pathologiques sur l'apparition de la mucoprotéine urinaire. *J. Physiol.*, 1954, 46, 536-540.

303. TAYEAU F. et ROLLAND R.- Le pouvoir absorbant des protéides vis à vis des sels biliaires. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, 29, 108-111.

304. TAYEAU F. et ROLLAND R.- Nouvelles recherches sur le vieillissement du sérum sanguin. Modification du système lipoprotéidique en fonction de la conservation aseptique du sérum. *C.R. Soc. biol.*, 1949, 143, 394-395.

305. TAYEAU F., TIXIER M., REBEYROTTE P. et BALLIVIAN-ROSADO L.- De la cholestérolestérase à la lécithine : cholestérol-acyl-transférase. Etude historique. Recherches expérimentales. *Bordeaux méd.*, 1973, 6, 3205-3219.

306. THEORELL A.H.- Studies on the lipoids of the blood plasma. *Biochem. Z.*, 1930, 223, 1-99.

307. THOMPSON G.R., SEGURA R., HOFF H. et GOTTO A.M.- Contrasting effects on plasma lipoproteins of intravenous versus oral administration of a triglyceride-phospholipid emulsion. *European J. Clin. Invest.*, 1975, 5, 373-384.

308. THUDICUM.- d'après (170).

309. TRIA E. et SCANU A.M.- Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems. 1 vol., Acad. Press. édit., London, New-York, 1969.

310. TROENSEGAARD et KOUDAHL.- Z. physiol. Chem. 1926, 153, 93 et 111, d'après (280).

311. VAITON C. et BACQUES C.- Connaissances actuelles sur la structure et le métabolisme des lipoprotéines. *Lyon pharm.*, 1976, 27, 233-258.

312. VANDENHEUVEL F.A.- The origin, metabolism and structure of normal human serum lipoproteins. *Canad. J. Biochem.*, 1962, 40, 1299-1326.

313. VANDENHEUVEL F.A.- Study of biological structure at the molecular level with stereomodel projections. I - The lipids in the myelin sheath of nerve. *J. Am. Oil chem. Soc.*, 1963, 40, 455-471.

314. VERZAR F. et VON KUTHY A.- Die verbindung der gepaarten Gullensaüren mit Fettsaüren u. ihre Beduntung für die Fettresorption. *Biochem. Z.*, 1929, 210, 280-285.

315. WAGNER A. et POINDEXTER C.A.- Esterification of serum cholesterol. I - Serial determinations in health. *J. Lab. clin. Med.*, 1952, 40, 321-323.

316. WAGNER A., ROGALSKI L. et EVANSTON.- Esterification of serum cholesterol. II - Influence of phosphatide and other factors. *J. Lab. clin. Med.*, 1952, 40, 324-333.

317. WAGNER A. et ROGALSKI L.- Esterification of serum cholesterol. III - In hypercholesterolemic rabbits. *J. Lab. clin. Med.*, 1952, 40, 334-336.

318. WETMORE S., MAHLEY R.W., BROWN W.V. et SCHACHTER H.- Incorporation of sialic acid into sialidase-treated apolipoprotein of human very low density lipoprotein by a pork liver sialytransferase. *Can. J. Biochem.*, 1974, 52, 655-664.

319. WHEREAT A.E. et STAPLE A.- The preparation of serum lipoproteins labeled with radioactive cholesterol. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, 90, 224-228.

320. WHITE C.P.- Cholesterol-fatty acid combinations. *J. Physiol.*, 1908, 38, VI, d'après (280).

321. WILCOX H.G., DUNN G.D. et HEIMBERG M.- Effects of several common long chain fatty acids on the properties and lipid composition of the VLDL secreted by the perfused rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 392, 39-54.

322. WINDMUELLER H.G., HERBERT P.N. et LEVY R.I.- Biosynthesis of lymph and plasma lipoprotein apoproteins by isolated perfused rat liver and intestine. *J. Lipid Res.*, 1973, 14, 215-223.

323. WINDMUELLER H.G. et LEVY R.I.- Production of β-lipoprotein by intestine in the rat. *J. biol. Chem.*, 1968, 243, 4878-4884.

324. WINDMUELLER H.G., LINDGREN F.T., LOSSOW W.J. et LEVY R.I.- On the nature of circulatin lipoproteins of intestinal origin in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 202, 507-516.

325. WINDMUELLER H.G. et SPAETH A.E.- De novo synthesis of fatty acid in perfused rat liver as a determinant of plasma lipoprotein production. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1967, 122, 362-369.

326. YON J.- Structure et dynamique conformationnelle des protéines, 1 vol, Hermann édit. Paris 1969.

327. ZILVERSMIT D.B.- *J. Coll. Sc.*, 1963, 18, 794.

328. ZILVERSMIT D.B.- Formation and transport of chylomicrons. *Fed. Proc.*, 1967, 26, 1599-1605.

Editions BERGERET - 71 73, rue Leyteire 33000 BORDEAUX -
Tél. (56) 91.12.59

DEUXIÈME THÈSE

LA LIPOPROTÉINE X.

Vu,
Le Président de l'Université de Bordeaux II :
J. LATRILLE

Vu, bon à imprimer,
Le Président de Thèse :
F. TAYEAU

Vu et permis d'imprimer,
Bordeaux, le 26 mars 1977
Le Chancelier des Universités :
R. PAULIAN